

**Biochemische und funktionelle Charakterisierung  
der C-terminalen Domänen der Molybdäncofaktor-Sulfurasen  
ABA3 und HMCS aus *Arabidopsis thaliana* und *Homo sapiens***

**Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n**

**von Silke Wollers  
aus Norden**

<b>1. Referent:</b>	<b>Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel</b>
<b>2. Referent:</b>	<b>Prof. Dr. Dieter Jahn</b>
<b>eingereicht am:</b>	<b>17.12.2007</b>
<b>mündliche Prüfung (Disputation) am:</b>	<b>04.02.2008</b>

**Druckjahr 2008**

## **Meinen Eltern**

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Heidenreich, T., Wollers, S., Mendel, R.R., and Bittner, F. (2005) "Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration", *J. Biol. Chem.* 280 (6): 4213–4218.

Havemeyer, A., Bittner, F., Wollers, S., Mendel, R.R., Kunze, T., and Clement, B. (2006) "Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug converting system as a novel molybdenum enzyme." *J. Biol. Chem.* 281(46): 34796-802

Wollers, S., Heidenreich, T., Zarepour M., Zachmann D., Kraft, C., Zhao Y., Mendel, R.R., and Bittner, F. (2008) "Binding of sulfurated molybdenum cofactor to the C-terminal domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration" *J. Biol. Chem.*; im Druck

## **Tagungsbeiträge**

Heidenreich, T., Wollers, S., Schulze, J., Nowak, K., Dean, D.R., Mendel, R.R., and Bittner, F.: "The *Arabidopsis* molybdenum cofactor sulfurase ABA3 is a two domain protein combining characteristics of iron-sulfur cluster assembly proteins and chaperons." Poster Präsentation: Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Braunschweig, 2004

Bittner, F., Wollers, S., Heidenreich, T., Zarepour, M., Nowak, K., and Mendel, R.R.: "ABA3 controls the activity of stress responsive proteins for ABA-synthesis and ROS-production." Poster Präsentation 18. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, 2005

Bittner, F., Heidenreich, T., Wollers, S., and Mendel, R.R.: "Cytoplasmic Fe-S Proteins and Cysteine-Desulfurase Activity are essential for Biogenesis and Functioning of Molybdenum Enzymes in Plants." Poster Präsentation 31st Steenbock Symposium " Fe-S Biogenesis: Biogenesis, Structure and Function"; Madison/USA; 2005

Wollers, S., Heidenreich, T., Mendel, R.R., and Bittner, F.: Biochemical Characterisation of the C-terminal Domain of the Molybdenum Cofactor Sulfurase ABA3 from *Arabidopsis thaliana*; Poster Präsentation Gordon Research Conference "Molybdenum and Tungsten Enzymes"; The Queens College, Oxford/UK; 2005

Heidenreich, T., Wollers, S., Mendel, R.R., and Bittner, F.: Biochemical Characterisation of the NifS-like Domain of the Molybdenum Cofactor Sulfurase ABA3 from *Arabidopsis thaliana*; Poster Präsentation Gordon Research Conference "Molybdenum and Tungsten Enzymes"; The Queens College, Oxford/UK; 2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Die biologische Bedeutung des Molybdäns .....	1
1.2	Die Struktur des Molybdäncofaktors .....	2
1.3	Die Biosynthese des Molybdäncofaktors.....	4
1.4	Die Familien der Molybdoenzyme .....	7
1.5	Der terminale Schwefel der Xanthinoxidase-Familie .....	8
1.6	Die Moco-Sulfurasen HMCS und ABA3 .....	11
<b>2</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>16</b>
2.1	Charakterisierung von ABA3-CT .....	16
2.1.1	Expressionsbedingungen und Aufreinigung von ABA3-CT.....	16
2.1.2	FormA-Analyse.....	18
2.1.3	Biologischer Nachweis von Moco/MPT durch den <i>nit-1</i> -Assay .....	18
2.1.4	Molybdän-Bestimmung über Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry .....	19
2.1.5	Bestimmung des terminalen Schwefels am Moco von ABA3-CT .....	20
2.1.6	Molybdatfreie Expression von ABA3-CT.....	21
2.1.7	Bestimmung des $K_D$ -Wertes für Moco an ABA3-CT.....	22
2.1.8	Spektrale Eigenschaften von ABA3-CT .....	23
2.1.8.1	Spektrale Eigenschaften von in verschiedenen <i>E. coli</i> Expressionsstämmen exprimiertem ABA3-CT .....	24
2.1.8.2	Anaerobe Aufreinigung von ABA3-CT.....	26
2.1.8.3	Einfluss von Oxidation und Reduktion auf die spektralen Eigenschaften von ABA3- CT.....	27
2.1.8.4	Anaerobe Dithionit-Titration.....	29
2.1.9	EPR-Spektroskopie von ABA3-CT .....	30
2.1.10	Bestimmung exponierter Cysteinreste an ABA3-CT .....	32
2.1.10.1	Detektion freier Sulfhydrylgruppen mit 1,5-I-AEDANS.....	33
2.1.10.2	Detektion freier Sulfhydrylgruppen mit DTNB.....	34
2.1.11	Cofaktorstabilität an ABA3-CT .....	34
2.1.12	Interaktion von ABA3-CT mit Aldehydoxidase und Xanthindehydrogenase .....	36
2.1.13	<i>in vitro</i> Transfer des Moco von ABA3-NifS zu ABA3-CT.....	37
2.1.14	Charakterisierung der <i>sir3-3</i> -Mutante aus <i>A. thaliana</i> .....	38
2.1.14.1	Analyse der AO- und XDH-Aktivität von <i>sir3-3</i> Pflanzen.....	40

2.1.14.2	Klonierung und Expression von ABA3-CT/R723K.....	41
2.1.14.3	Charakterisierung der Cofaktorbindung an R723K-CT .....	42
2.1.14.4	Spektrale Analyse von R723K-CT.....	44
2.1.15	Charakterisierung der ABA3-CT-Varianten ABA3-CT/C542S, ABA3-CT/C755S und ABA3-CT/C758S .....	44
2.1.15.1	Klonierung und Expression der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT .....	45
2.1.15.2	FormA-Analyse der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT .....	46
2.1.15.3	Biologischer Nachweis von Moco und MPT an C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT im <i>nit-1</i> NADPH-NR Rekonstitutions-Assay .....	47
2.1.15.4	Nachweis des terminalen Schwefels am Moco der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT .....	49
2.1.15.5	Cofaktorstabilität an den Varianten C542S-CT und C758S-CT .....	50
2.1.15.6	Spektrale Analyse der Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT.....	51
2.2	Charakterisierung der C-terminalen Domäne der humanen Moco-Sulfurase HMCS.....	53
2.2.1	Klonierung und Expression der C-terminalen Domäne von HMCS.....	53
2.2.2	Charakterisierung der Cofaktorbindung an HMCS-CT .....	55
2.2.3	Spektrale Analyse von HMCS-CT .....	57
2.2.4	Interaktion von HMCS-CT mit Aldehydoxidase aus Maus.....	57
2.2.5	Charakterisierung zweier konservierter Motive in HMCS-CT .....	58
2.2.5.1	Klonierung und Expression der HMCS-CT-Varianten.....	59
2.2.5.2	Charakterisierung der Cofaktorbindung an den HMCS-CT-Varianten P591S-CT und S594A-CT .....	61
2.2.5.3	Charakterisierung der Cofaktorbindung an den HMCS-CT-Varianten F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT .....	63
2.2.5.4	Charakterisierung der Cofaktorbindung an der Xanthinurie Typ II verursachenden Variante HMCS-CT/R776C-CT.....	67
2.3	Charakterisierung von zum Moco-Sulfurase C-Terminus homologen Proteinen .....	68
2.3.1	Identifizierung des <i>N</i> -reduktiven Systems .....	68
2.3.2	Western-Analyse der <i>N</i> -reduktiven Fraktionen.....	70
2.3.3	Biologischer Nachweis von Moco/MPT in den mitochondrialen Fraktionen mit <i>N</i> -reduktiver Aktivität im <i>nit-1</i> -NADPH-NR Rekonstitutions-Assay .....	71
2.3.4	<i>N</i> -reduktive Aktivität von HMCS-CT .....	71
2.3.5	<i>N</i> -reduktive Aktivität der HMCS-CT-Varianten F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT...	73
2.3.6	Isolierung der humanen mitochondrial Amidoxime Reducing Component-Homologen 1 und 2 (mARC-Homologe 1 und 2).....	74

2.3.7	cDNA-Isolierung von <i>hmARC1</i> und <i>hmARC2</i> .....	75
2.3.8	Expression von hmARC2 .....	77
2.3.8.1	Expressionskinetik zur Expression von hmARC2.....	77
2.3.8.2	Western-Analyse der Expressionskinetik von hmARC2 .....	78
2.3.8.3	Expression von hmARC2 in größerem Maßstab.....	78
2.3.8.4	Western-Analyse von hmARC2 .....	79
2.3.8.5	Nachweis von Cofaktorbinding an hmARC2.....	80
2.3.8.6	FormA-Analyse.....	80
2.3.8.7	Biologischer Nachweis von Moco/MPT durch den <i>nit-1</i> -NADPH-NR Rekonstitutions-Assay .....	81
2.3.9	Bestimmung der Benzamidoxim-Reduktaseaktivität von ABA3-CT.....	82
2.3.9.1	Erstellung der NADH-Kalibriergeraden .....	82
2.3.9.2	Bestimmung der NADH-Zerfallsrate .....	82
2.3.9.3	Spektrometrische Vermessung von Benzamidoxim und Benzamidin .....	83
2.3.9.4	<i>N</i> -reduktive Aktivität von ABA3-CT .....	84
2.3.9.5	Benzamidoximreduktion durch chemisch sulfurierten ABA3-CT.....	85
2.3.9.6	Benzamidoximreduktaseaktivität der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT.....	86
<b>3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>88</b>
3.1	Die Moco-Sulfurase ABA3 aus <i>A. thaliana</i> .....	88
3.2	Rekombinante Überexpression von ABA3-CT.....	90
3.3	Rekombinante Überexpression von HMCS-CT.....	92
3.4	Besitzt ABA3-CT eine Moco-Insertase-/Transferase-Funktion? .....	93
3.5	Analyse natürlicher Mutationen aus ABA3-CT und HMCS-CT.....	95
3.6	Spektroskopische Eigenschaften von ABA3-CT .....	98
3.7	Mögliche Rollen der konservierten Cysteinreste in ABA3-CT .....	101
3.8	Transfer eines Persulfid-Schwefels von ABA3-NifS zu ABA3-CT.....	103
3.9	Mögliche <i>in vivo</i> Funktion der Moco-Sulfurase C-Termini.....	106
3.10	mARC ist ein zu den Moco-Sulfurase C-Termini homologes Molybdoenzym .....	109
3.11	Bindet mARC sulfurierten Moco? .....	112
3.12	Klonierung und rekombinante Expression von hmARC2 .....	112
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>114</b>
4.1	Materialien.....	114
4.1.1	Verwendete <i>E. coli</i> - und <i>P. pastoris</i> -Stämme.....	114

---

4.1.2	Plasmide.....	114
4.1.3	Primer .....	115
4.1.4	Antikörper .....	116
4.1.5	Häufig verwendete Chemikalien, Enzyme und Matrices.....	117
4.1.6	Geräte, Material und Software .....	118
4.2	Molekularbiologisches Arbeiten .....	119
4.2.1	Klonierungen .....	119
4.2.2	RNA-Isolation.....	119
4.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	120
4.2.4.1	Klonierungs-PCR .....	121
4.2.4.2	Fusions-PCR.....	121
4.2.5	DNA-Sequenzierung .....	122
4.3	Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	122
4.3.1	Pflanzenanzucht.....	123
4.3.2	Ernte und Verarbeitung des Pflanzenmaterials .....	123
4.4	Proteinbiochemische Arbeiten .....	124
4.4.1	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	124
4.4.2	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>P. pastoris</i> .....	125
4.4.2.1	Überexpression der AO $\alpha$ aus <i>A. thaliana</i> in <i>P. pastoris</i> .....	126
4.4.2.2	Proteinextraktion aus <i>P. pastoris</i> .....	126
4.4.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-getaggten Proteinen .....	127
4.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	127
4.4.5	Konzentrierung von Proteinlösungen .....	128
4.4.6	Umpuffern von Proteinlösungen .....	128
4.4.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	128
4.4.8	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) .....	128
4.4.9	Gelfiltration.....	129
4.4.10	Anionenaustauscher-Chromatographie.....	129
4.4.11	Immunoblot-Analyse .....	130
4.4.12	Antikörper-Aufreinigung.....	131
4.4.13	Bestimmung des cyanolisierbaren Schwefels am Moco.....	131
4.4.14	AO- und XDH-Aktivitätsassay im nativen Gel .....	132
4.4.15	Chemische Sulfurierung von <i>aba3</i> -Mutanten .....	132
4.4.17	<i>Nit-1</i> -Rekonstitutions-Assay zum Nachweis von Moco/MPT .....	133
4.4.18	MPT-Nachweis über FormA-dephospho.....	134
4.4.19	Nachweis freier Sulfhydrylgruppen durch DTNB .....	135



4.4.20	1,5-I-AEDANS In-Gel-Assay .....	135
4.4.21	Schwefelübertragung zwischen den ABA3-Domänen.....	135
4.4.22	Moco-Übertragung zwischen den ABA3-Domänen .....	136
4.4.23	Aktivierung von AO und XDH durch ABA3-CT/HMCS-CT .....	137
4.4.24	Bestimmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität für ABA3-CT.....	137
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>138</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>139</b>

## Abkürzungsverzeichnis

1,5-I-AEDANS	N-Iodoacetyl-N` (5-Sulfo-1-Naphthyl)Ethylendiamin
A	Absorption, Alanin
ABA	Abscisinsäure
ABA3	Abscisinsäure-defiziente Mutante 3
ABA3-CT	Carboxyl-terminale Domäne von ABA3
ABA3-NifS	NifS-ähnliche Domäne von ABA3
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
AO	Aldehydoxidase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AtCTD1	"Moco Sulphurase C-terminal domain containing 1" ( <i>A. thaliana</i> )
AtCTD2	"Moco Sulphurase C-terminal domain containing 2" ( <i>A. thaliana</i> )
ATP	Adenosin-Triphosphat
AU	Absorptionseinheit
b <sub>5</sub> -Reduktase	NADH-Cytochrom b <sub>5</sub> Reduktase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidin-Salz
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serum-Albumin Fraktion V
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff, Cystein
ca.	circa
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
C-terminal	Carboxyl-terminal
° C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CN <sup>-</sup>	Cyanid
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	didesoxy-Nucleosidtriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuclease
DTNB	5,5` -Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	Elektronen-Paramagnetische Resonanz
ESI	Elektrospray Ionisierung
EtBr	Ethidiumbromid
F	Phenylalanin
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FE	Flächeneinheiten
Fe-S	Eisen-Schwefel
g	Erdbeschleunigung
G	Gauss

---

GHz	Gigahertz
GTP	Guanosindiphosphat
HAP	6- <i>N</i> -Hydroxylaminopurin
h	Stunde
His-Tag	Histidin-Tag
HMCS	humane Molybdän-Cofaktor-Sulfurase
HMCS-CT	Carboxyl-terminale Domäne von HMCS
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HsCTD1	„Moco Sulphurase C-terminal domain containing 1“ ( <i>H. sapiens</i> )
HsCTD2	„Moco Sulphurase C-terminal domain containing 2“ ( <i>H. sapiens</i> )
IES	Indolessigsäure
IgG	ImmunglobulinG
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin, Lysin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
Konz.	Konzentration
LB	Luria Broth
M	molar
mA	Milliampere
ma-l	maroon-like
mARC	mitochondrial amidoxime reducing component
MCP	Moco Carrier Protein
MCS	Multiple cloning site
MCSU	Molybdäncofaktor-Sulfurase aus Rind
mg, $\mu$ g, ng	Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
MGD	Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid
min	Minute
mM	Millimolar
Mo	Molybdän
Moco	Molybdäncofaktor
MPT	Molybdopterin
MPT-AMP	adenyliertes MPT
mRNA	“messenger“-RNA
MS	Massenspektrometrie
mW	Milliwatt
MWCO	molecular weight cut-off
$\mu$ mol, nmol, pmol	Mikromol, Nanomol, Picomol
N	Stickstoff, Asparagin
NAD(P)H	Nicotinadenindinucleotid(phosphat) reduziert
ND	nicht detektierbar
NED	14-(1-Naphtyl)-Ethylendiamin-dihydrochlorid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-tri-Acetat
nm	Nanometer
NR	Nitratreduktase
NH <sub>2</sub> -Terminus	Amino-Terminus
NH <sub>2</sub> -terminal	Amino-terminal
O	Sauerstoff
OD	optische Dichte
OMV	äußere Membranfraktion (outer membrane vesicles)
P	Prolin

PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLP	Pyridoxalphosphat
pmol	Picomol
PMS	Phenazinmethosulfat
PVDF	Polyvinylidon-Difluorid
Q	Glutamin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
S	Schwefel, Serin
SA	Sulfanilamid
sec	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SO	Sulfitoxidase
Tab.	Tabelle
TCEP	Tris (2-Carboxyethyl)Phosphin hydrochlorid
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜN	über Nacht
UV-Licht	ultraviolettes Licht
Vol.	Volumen
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase
XOR	Xanthinoxidoreduktase
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

## Abkürzungen von Artnamen

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. vinelandii</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. nidulans</i>	<i>Emmericella nidulans</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>R. capsulatus</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1:	SDS-PA-Gelanalyse des ABA3-CT nach affinitätschromatographischer Aufreinigung.....	17
Abb. 2-2:	NADPH NR-Rekonstitution im <i>nit-1</i> -Assay durch ABA3-CT.....	19
Abb. 2-3:	Bindung von Moco an ABA3-CT. ....	23
Abb. 2-4:	Spektrale Eigenschaften von ABA3-CT.....	24
Abb. 2-5:	SDS-PA-Gelanalyse der affinitätschromatographisch aufgereinigten ABA3-CT aus verschiedenen Expressionsstämmen .....	25
Abb. 2-6:	Spektrale Eigenschaften von ABA3-CT aus verschiedenen <i>E. coli</i> -Expressionsstämmen .....	26
Abb. 2-7:	Spektrale Eigenschaften von ABA3-CT nach anaerober Aufreinigung .....	27
Abb. 2-8:	UV/VIS-Spektren von ABA3-CT in Gegenwart von Reduktionsmitteln,.....	28
Abb. 2-9:	UV/VIS-Spektren von ABA3-CT in Gegenwart von Reduktionsmitteln, Ferricyanid und Kaliumcyanid nach 24 h.....	29
Abb. 2-10:	Anaerobe Natriumdithionit-Titration von ABA3-CT.....	30
Abb. 2-11:	EPR-Spektren von ABA3-CT .....	32
Abb. 2-12:	Nachweis exponierter Cysteine an ABA3-CT.....	34
Abb. 2-13:	Moco-Stabilität an ABA3-CT .....	35
Abb. 2-14:	Aktivitätssteigerung von <i>A. thaliana</i> AOα und XDH1 durch ABA3-CT.....	37
Abb. 2-15:	Western-Analyse der AO-Aktivitätsbanden.....	37
Abb. 2-16:	<i>in vitro</i> Transfer des Moco von ABA3-NifS zu ABA3-CT. ....	38
Abb. 2-17:	Sequenz-Alignment von Moco-Sulfurase C-Termini.....	39
Abb. 2-18:	Phänotyp der <i>A. thaliana sir3-3</i> -Mutante .....	40
Abb. 2-19:	AO- und XDH-Aktivitäten der <i>sir3-3</i> -Mutante .....	41
Abb. 2-20:	SDS-PA-Gelanalyse der affinitäts-chromatographisch aufgereinigten Variante ABA3-CT/R723K im Vergleich mit ABA3-CT.....	42
Abb. 2-21:	Cofaktorbindung an R723K-CT.....	43
Abb. 2-22:	Spektrale Eigenschaften von R723K-CT .....	44
Abb. 2-23:	SDS-PA-Gelanalyse der affinitätschromatographisch aufgereinigten ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT .....	46
Abb. 2-24:	FormA-Analyse der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT .....	47
Abb. 2-25:	NADPH NR-Rekonstitution im <i>nit-1</i> -Assay der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT.....	48

Abb. 2-26:	Nachweis des terminalen Schwefels an den ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT.....	50
Abb. 2-27:	Bestimmung der Halbwertszeit der Cofaktorbinding an C542S-CT und C758S-CT .....	51
Abb. 2-28:	Spektrale Eigenschaften der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT.....	52
Abb. 2-29:	Amplifizierung der cDNAs von <i>hmcs-CT1</i> und <i>hmcs-CT2</i> .....	53
Abb. 2-30:	SDS-PA Gelanalyse von HMCS-CT1 und HMCS-CT2 nach Aufreinigung durch Anionenaustauscher- und Größenausschlusschromatographie.....	54
Abb. 2-31:	SDS-PA-Gelanalyse des affinitätschromatographisch aufgereinigten HMCS-CT .....	55
Abb. 2-32:	Spektrale Eigenschaften von HMCS-CT.....	57
Abb. 2-33:	Interaktion von HMCS-CT mit Maus-AO.....	58
Abb. 2-34:	SDS-PA-Gelanalyse der affinitätschromatographisch aufgereinigten HMCS-CT-Varianten. ....	60
Abb. 2-35:	FormA-Analyse der HMCS-CT-Varianten P591S-CT und S594A-CT.....	62
Abb. 2-36:	NADPH NR-Rekonstitution im <i>nit-1</i> -Assay der HMCS-CT-Varianten P591S-CT und S594A-CT .....	62
Abb. 2-37:	FormA-Analyse der HMCS-CT-Varianten R776K-CT, F775Y-CT und N778Q-CT .....	64
Abb. 2-38:	NADPH NR-Rekonstitution im <i>nit-1</i> -Assay von F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT .....	65
Abb. 2-39:	Molybdän-Bestimmung an HMCS-CT, F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT .....	66
Abb. 2-40:	Cofaktoranalyse von R776C-CT.....	67
Abb. 2-41:	Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch das mitochondrielle <i>N</i> -reduktive System.....	69
Abb. 2-42:	Elutionsprofil der Benzamidoximreduktase-haltigen Fraktionen nach Anionenaustauscher-Chromatographie an DEAE-Cellulose .....	69
Abb. 2-43:	Western-Analyse der aus der OMV von Schweinelebermitochondrien aufgereinigten Fraktionen mit <i>N</i> -reduktiver Aktivität .....	70
Abb. 2-44:	Sequenz-Alignment von HMCS-CT, ABA3-CT und den mARC-homologen Proteinen aus <i>A. thaliana</i> und <i>H. sapiens</i> .....	74
Abb. 2-45:	Genomische und cDNA Struktur von <i>hmARC1</i> und <i>hmARC2</i> .....	75
Abb. 2-46:	Ergebnis der Fusions-PCR zur Amplifizierung der cDNAs von <i>hmARC1</i> und <i>hmARC2</i> .....	76
Abb. 2-47:	Affinitätschromatographisch aufgereinigtes hmARC2 nach unterschiedlichen Expressionsbedingungen .....	79
Abb. 2-48:	Western-Analyse der Expressionsansätze von hmARC2 .....	80

Abb. 2-49:	pH-abhängiger Zerfall von NADH bei RT.....	83
Abb. 2-50:	Absorptionsspektren von Benamidin und Benamidoxim .....	84
Abb. 2-51:	<i>N</i> -reduktive Aktivität von chemisch sulfuriertem und unbehandeltem ABA3-CT ....	86
Abb. 3-1:	Schwefelübertragung von ABA3-NifS auf ABA3-CT .....	104
Abb. 3-2:	Persulfid-Nachweis an ABA3-CT sowie den Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT. ....	105

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Charakterisierung des Cofaktors an ABA3-CT .....	20
Tab. 2-2: Cofaktorbindung an ABA3-CT nach Expression ohne Molybdatzugabe.....	22
Tab. 2-3: Charakterisierung des Cofaktors an HMCS-CT. ....	56
Tab. 2-4: Nachweis des terminalen Schwefels an den HMCS-CT-Varianten P591S-CT, und S594A-CT.....	63
Tab. 2-5: Nachweis des terminalen Schwefels an den HMCS-CT-Varianten F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT. ....	66
Tab. 2-6: Rekonstitution der NADPH NR-Aktivität im <i>nit-1</i> -Assay durch die Fraktionen A und B .....	71
Tab. 2-7: Nachweis der <i>N</i> -reduktiven Aktivität für HMCS-CT .....	72
Tab. 2-8: <i>N</i> -reduktive Aktivitäten der HMCS-CT-Varianten F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT .....	73
Tab. 2-9: <i>nit-1</i> -Assay verschiedener Expressionsansätze von hmARC2.....	82
Tab. 2-10: NADH-Umsatzraten und FormA-Mengen verschiedener ABA3-CT-Chargen .....	85
Tab. 2-11: <i>N</i> -reduktive Aktivität der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT .....	87
Tab. 4-1: Verwendete <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i> -Stämme .....	114
Tab. 4-2: Verwendete Plasmide .....	114
Tab. 4-3: Verwendete Primer.....	115
Tab. 4-4: Verwendete Antikörper .....	116
Tab. 4-5: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Matrices .....	117
Tab. 4-6: Verwendete Materialien und Geräte.....	118
Tab. 4-7: Verwendete Software .....	119



# 1 Einleitung

## 1.1 Die biologische Bedeutung des Molybdäns

Molybdän ist ein Metall der sechsten Nebengruppe des Periodensystems und als Spurenelement essentiell für alle Organismen. Seine Relevanz erhält es als Bestandteil des aktiven Zentrums der Molybdoenzyme, die an Redoxreaktionen des globalen Schwefel-, Stickstoff- und Kohlenstoffkreislaufs beteiligt sind (Hille, 1996).

Biologisch aktiv wird das Molybdän durch die Einbindung in einen universellen Molybdäncofaktor (Moco), in dem es durch ein einzigartiges Pterin, das Molybdopterin (MPT), komplexiert wird.

Mittlerweile sind mehr als 50 verschiedene Molybdoenzyme bekannt, die überwiegend bakteriellen Ursprungs sind (Mendel und Bittner, 2006). Die Bedeutung des Molybdäns für das Wachstum von Mikroorganismen wurde bereits 1930 von Bortels beschrieben und Mangelerscheinungen bei Nutzpflanzen wurden vor circa sechzig Jahren erstmalig auf eine Molybdändefizienz und den damit verbundenen Verlust der Nitratreduktase-Aktivität zurückgeführt (zusammengefasst von Gupta, 1997). Die Nitratreduktase (NR) katalysiert die Schlüsselreaktion in der anorganischen Stickstoffassimilation und ist somit das wichtigste pflanzliche Molybdoenzym. Zu den weiteren Molybdoenzymen in Pflanzen gehören mehrere Aldehydoxidasen (AOs), die z.B. den letzten Schritt der Biosynthese der Phytohormone Abscisin- und Indolessigsäure katalysieren (Koshiba *et al.*, 1996; Walker-Simmons *et al.*, 1989; Taylor, 1991; Seo *et al.*, 2000), sowie die Xanthindehydrogenase (XDH), die am Purin-Katabolismus beteiligt ist (Nguyen, 1986). Der Sulfitoxidase (SO) schließlich wird eine Rolle bei der Sulfitdetoxifikation und dem Abbau schwefelhaltiger Aminosäuren zugeschrieben (Schwarz und Mendel, 2006).

Die Enzymassoziiierung des Molybdäns zeigten Reichert und Westerfeld (1953) durch den Nachweis von Molybdän in der XO aus Rattenleber und -magen. Bald darauf wurde auch die Molybdän-Abhängigkeit tierischer AOs (Mahler *et al.*, 1954) sowie der NR des Ascomyceten *Neurospora crassa* (Nicholas *et al.*, 1954; Nicholas and Nason, 1954) beschrieben, bevor schließlich 1971 mit der SO das erste humane Molybdoenzym durch Cohen *et al.* identifiziert wurde.

Den ersten Hinweis auf einen einheitlichen Cofaktor der Molybdoenzyme erhielten Pateman *et al.* 1964 durch die Isolation von NR-Mutanten des filamentösen Pilzes *Emericella nidulans*. Von sechs Mutanten mit Verlust der NR-Aktivität zeigten fünf einen simultanen Ausfall der ebenfalls Molybdän-abhängigen XDH-Aktivität. Da die Molybdän-Abhängigkeit die einzige Gemeinsamkeit dieser beiden völlig unterschiedliche Reaktionen katalysierende Enzyme ist,

wurde ein gemeinsamer Molybdän enthaltender Cofaktor vorgeschlagen, der in den pleiotropen Mutanten nicht synthetisiert werden kann.

Die Genloci der an der Cofaktor-Biosynthese beteiligten Enzyme wurden entsprechend mit „*cnx*“ für „*c*ofactor for *n*itrate reductase and *x*anthine dehydrogenase“ bezeichnet. Diese Nomenklatur wird auch heute noch für die Enzyme der pflanzlichen und pilzlichen Moco-Biosynthese verwendet. Für die bakterielle Moco-Biosynthese wurden hingegen die Operon-Bezeichnungen „*moa*, *mob*, *mod*, *moe*, *mog*“ und für das humane System die Bezeichnung „*mocs*“ (**m**olybdenum **c**ofactor **s**ynthesis) eingeführt.

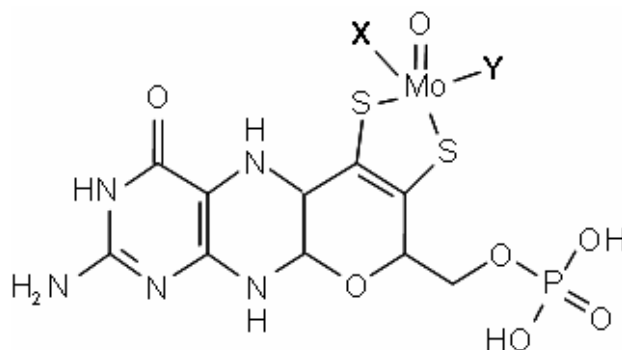
Den funktionellen Nachweis eines universellen unter den Organismen austauschbaren Moco lieferten Nason *et al.* (1971) durch Arbeiten mit der *nit-1*-Mutante aus *Neurospora crassa* (Sorger und Giles, 1965). Diese Mutante ist nicht in der Lage aktiven Moco zu synthetisieren und weist somit eine inaktive Apo-NR auf. Nason *et al.* gelang der Nachweis einer Rekonstitution der NR-Aktivität durch niedermolekulare Fraktionen denaturierter Molybdoenzyme pflanzlicher, tierischer und bakterieller Herkunft. Unter den molybdänhaltigen Enzymen führte lediglich die Nitrogenase zu keiner funktionellen Komplementation, woraufhin eine abweichende Struktur der Molybdän enthaltenden Komponente angenommen wurde (Pienkos *et al.*, 1977). Wenig später zeigte sich, dass das Molybdän der Nitrogenase über Homocitrat im sogenannten Fe-Moco komplexiert wird (Shah und Brill, 1977).

## 1.2 Die Struktur des Molybdäncofaktors

Bedingt durch die Oxidationssensitivität und der damit verbundenen Instabilität des Moco wurden die Strukturuntersuchungen anhand von stabileren Degradations- und Oxidationsprodukten vorgenommen. Als organische Grundstruktur wurde 1980 von Johnson *et al.* eine Pterinverbindung vorgeschlagen und weitere Untersuchungen mit den Derivaten FormA und FormB zeigten die Präsenz einer 4-C-Seitenkette und eines terminalen Phosphatesters am C6-Atom der Pterinkomponente (Johnson *et al.*, 1984). Durch die strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem Oxidationsprodukt FormB und dem natürlichen Metaboliten Urothion wurde auf die Gegenwart von Schwefelgruppen im Moco geschlossen (Johnson und Rajagopalan, 1982) und die spezifische Alkylierung zu Carboxyamidodimethyl-MPT durch Iodacetamid brachte schließlich den Nachweis einer Dithiolengruppe am C1- und C2-Atom der Seitenkette (Kramer *et al.*, 1987). Basierend auf diesen Daten wurde ein erstes Modell des aktiven Moco postuliert, das eine Assoziierung des Molybdäns über die Dithiolengruppe an eine bizyklische 5,6,7,8-Tetrahydropterinkomponente vorsah (Kramer *et*

*al.*, 1987). Seitdem wird die aktive Molybdän enthaltende Form des Cofaktors als Moco und die inaktive molybdänfreie Form als MPT oder Metall-bindendes Pterin bezeichnet.

Dieses erste Strukturmodell konnte nach der Kristallisation des Molybdoenzyms Aldehydoxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* durch Romao *et al.* (1995) grundsätzlich bestätigt werden. Als einziger Unterschied zum abgeleiteten Modell zeigte sich statt einer bityklischen eine trityklische Struktur, die durch die Ausbildung eines Pyranoringes zwischen der Hydroxygruppe am C3-Atom der Seitenkette und dem C7-Atom des Pterins entsteht (Abb. 1-1). Die Kristallisation weiterer bakterieller Molybdoenzyme in der Folgezeit (Schindelin *et al.*, 1997; Boyington *et al.*, 1997; Kisker *et al.*, 1997) bestätigte die Struktur des Moco als 5,6,7,8-Tetrahydropyranopterin, die, basierend auf den Erkenntnissen mit der *nit-1*-Mutante aus *Neurospora crassa*, als konserviert unter allen Organismen vorgeschlagen wurde. Zwar kommt es in Eubakterien zu einer weiteren Modifikation des Moco indem ein Nukleotid über eine Pyrophosphatbindung an das C4-Atom der Seitenkette gebunden wird (Johnson *et al.*, 1990; Börner *et al.*, 1991) und der anschließenden Bildung der bis-MPT-Guanin-Dinukleotid-Form des Cofaktors (Schindelin *et al.*, 1996; Solomon *et al.*, 1997). Es kann dennoch weiterhin von einer universellen Struktur des Moco gesprochen werden.



**Abb. 1-1:**            **Strukturformel des eukaryotischen Molybdäncofaktors.** Gezeigt ist die durch Kristallisation bestätigte Struktur des 4,5,6,7-Tetrahydropyranopterin.

### 1.3 Die Biosynthese des Molybdäncofaktors

Aufgrund der einheitlichen Struktur des Moco und der Identifizierung von bis zu sechs genetischen Komplementationsgruppen in Moco-defizienten Mutanten eines Organismus, konnte von einem konservierten Biosyntheseweg des Moco ausgegangen werden, der in mehrere Schritte unterteilt ist (Rajagopalan *et al.* 1992, Mendel 1997).

Ein erstes Modell der Moco-Biosynthese wurde durch die biochemische und molekularbiologische Charakterisierung des *E. coli*- Systems gewonnen, für das fünf Moco-spezifische Operons bekannt sind (Rajagopalan *et al.* 1992). Das bakterielle Modell konnte weitgehend auf die eukaryotische Moco-Biosynthese übertragen werden, die vor allem durch die Analyse von Moco-Mutanten in höheren Pflanzen entziffert wurde (Mendel, 1997). Anhand der Biosynthese-Intermediate cPMP (**c**yclic **p**yrano**pt**erin-**m**ono**p**hosphate; IUPAC-Nomenklatur: 1',1'-dihydroxy-2',4'-zyklisches-Pyranopterin-Monophosphat), MPT, MPT-AMP und Moco kann die Unterteilung in vier Schritte erfolgen (Abb 1-2). In Eukaryoten wurden sowohl für Pflanzen und Pilze als auch für den Menschen jeweils sechs Genprodukte identifiziert, die diese Schritte katalysieren:

Im ersten Schritt wird GTP zu cPMP umgewandelt (Hänzelmann *et al.*, 2006), dessen chemische Struktur 2004 durch Massenspektroskopie und <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopie von Santamaria-Araujo *et al.* aufgelöst wurde. Hierbei handelt es sich bereits um eine voll reduzierte schwefelfreie Tetrahydropyranopterin-Struktur, die auch die Moco-typische 4-C-Seitenkette aufweist und das stabilste Intermediat der Moco-Biosynthese darstellt.

Diese Konversion wird in *E.coli* durch MoaA und MoaC katalysiert (Rivers *et al.*, 1993). Für *A. thaliana* konnten Cnx2 und Cnx3 diesem Schritt aufgrund einer funktionellen Komplementation von *moaA*- und *moaC*-Mutanten zugeordnet werden (Hoff *et al.*, 1995) was die evolutionäre Konservierung der Moco-Biosynthese bestätigte. Im Menschen katalysieren MOCS1A und MOCS1B die cPMP-Bildung (Reiss, 2000).

Die Übertragung zweier Schwefelatome zur Bildung der Dithiolengruppe und damit des Zwischenproduktes MPT erfolgt im zweiten Schritt durch die MPT-Synthase (Pitterle und Rajagopalan, 1993). Die MPT-Synthase ist ein Heterotetramer aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten, die sich in Pflanzen aus Cnx6 und Cnx7 und im Menschen aus MOCS2A und MOCS2B zusammensetzt und in Bakterien durch *moaD* und *moaE* kodiert wird (Schwarz und Mendel, 2006). Der zu übertragende Schwefel ist jeweils am C-Terminus der kleinen Untereinheit gebunden. Nach erfolgter Schwefelübertragung ist eine Reaktivierung der MPT-Synthase durch Adenylierung und anschließende Sulfurierung notwendig, die in Prokaryoten durch MoeB (Adenylierung, Leimkühler und Rajagopalan, 2001) und zumindest

*in vitro* durch eine L-Cystein-Desulfurase (Sulfurierung, Leimkühler und Rajagopalan, 2001) bzw. durch YnjE (Dissertation A. Bolte, 2005), erfolgt. Beide Schritte werden in Eukaryoten durch die MPT-Synthase-Sulfurase übernommen, die in *A. thaliana* ein Genprodukt von *cnx5* und im Menschen von *mocs3* ist (zusammengefasst durch Schwarz und Mendel, 2006). Mit der Bildung des MPT wird das Grundgerüst für die Insertion und Koordination des Molybdäns bereitgestellt.

Die Molybdän-Insertion wird in Prokaryoten durch die beiden Proteine MoeA und MogA, in Eukaryoten jedoch durch das Zwei-Domänenprotein Gephyrin (*H. sapiens*) bzw. Cnx1 (*A. thaliana*) katalysiert (Stallmeyer *et al.*, 1995 und 1999; Schwarz *et al.*, 2000). Im dritten Schritt der Moco-Biosynthese adenyliert die MogA-homologe G-Domäne dieser Enzyme dafür unter Verbrauch von ATP zunächst  $Mg^{2+}$ -abhängig MPT zu MPT-AMP, wobei das Adenosin des AMP über ein Pyrophosphat kovalent an das C4'-Atom des MPT gebunden wird (Llamas *et al.*, 2004). In dieser Phase bildet ein Kupferatom den Liganden der Dithiolengruppe von MPT und MPT-AMP, so dass es hier zu einer Interaktion des Molybdän- und Kupfer-Metabolismus kommt (Kuper *et al.*, 2004).

Im vierten und für Eukaryoten letzten Schritt erfolgt die Freisetzung des AMP und die Insertion des Molybdäns unter Bildung des fertigen Moco. Das MPT-AMP wird zunächst von der G- auf die E-Domäne transferiert, wo es zur  $Mg^{2+}$ -abhängigen Abspaltung des AMP kommt. Gleichzeitig wird Kupfer durch Molybdän als Ligand ersetzt (Llamas *et al.*, 2006).

Bei Prokaryoten katalysieren abschließend MobA und MobB die Bildung der MPT-Guanin-Dinukleotid-Form (MGD) des Moco durch Anhängen eines Nukleotids. (Palmer *et al.*, 1994 und 1996).

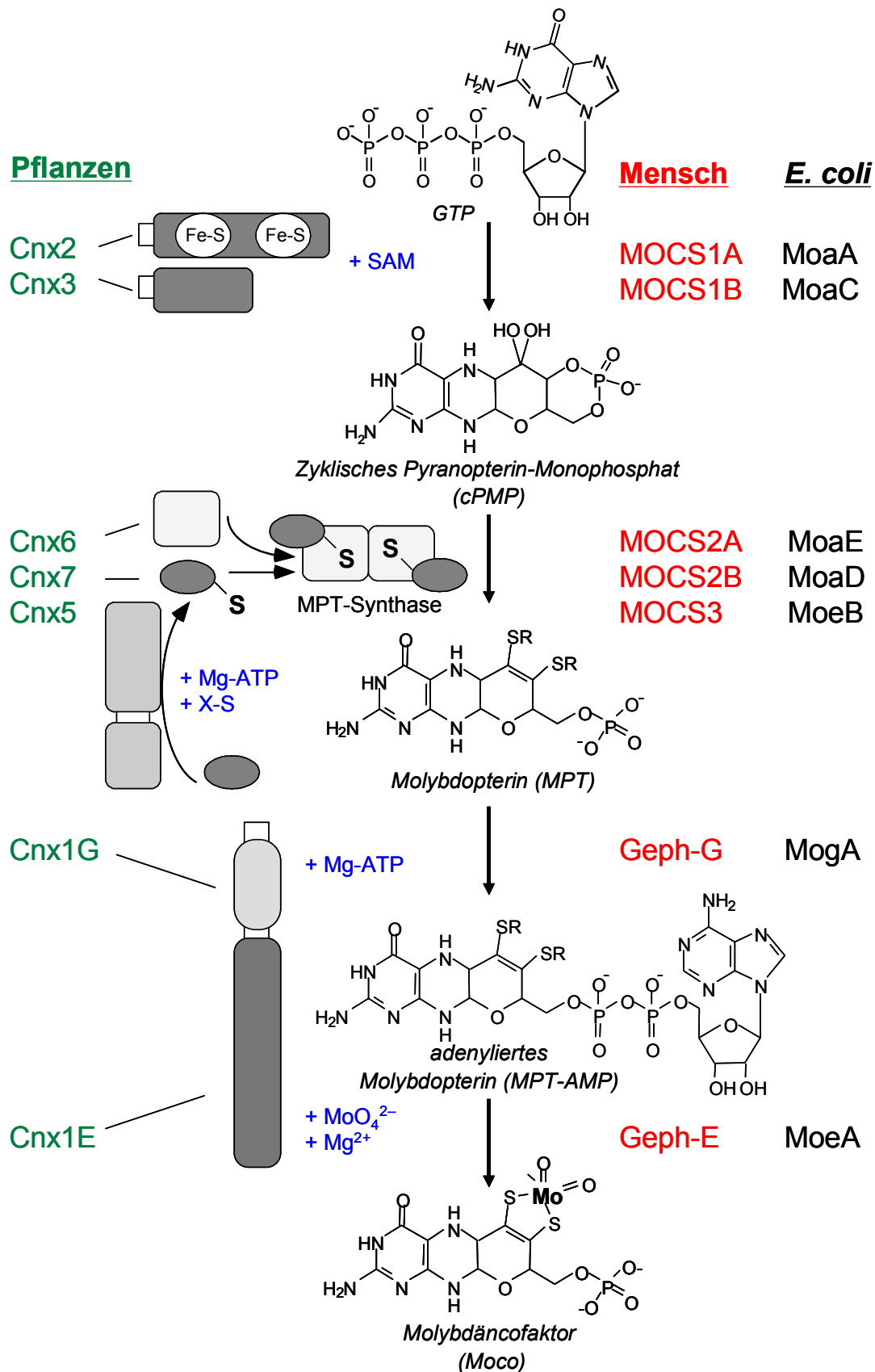


Abb. 1-2:

**Modell der Molybdäncofaktor-Biosynthese.** Ausgehend von GTP wird über die detektierbaren Intermediate cPMP, MPT und MPT-AMP der Moco synthetisiert. Die an der Biosynthese beteiligten Enzyme sind für *A. thaliana* (grün), für den Menschen (rot) und für *E. coli* (schwarz) angegeben.

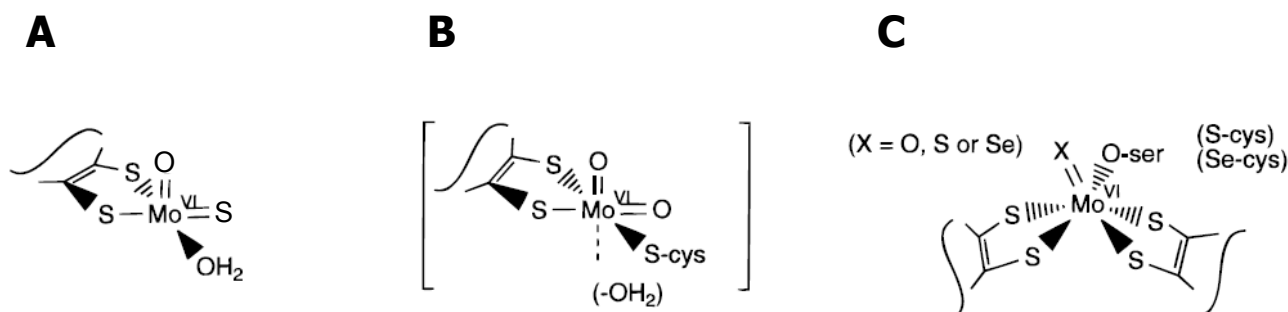
## 1.4 Die Familien der Molybdoenzyme

Alle mononuklearen Molybdoenzyme katalysieren den Transfer eines Sauerstoffatoms zum bzw. vom Substrat in einer Zwei-Elektronen übertragenden Redoxreaktion wobei es am Molybdän zu einem Wechsel zwischen den Oxidationsstufen VI(oxidiert) und IV(reduziert) kommt (Hille, 1996).

Die bisher charakterisierten, überwiegend bakteriellen, Enzyme werden basierend auf der Struktur ihres aktiven Zentrums in drei Familien unterteilt: die DMSO-Reduktase-Familie, die SO-Familie und die XO-Familie (Abb. 1-3):

- Die DMSO-Reduktase-Familie umfasst ausschließlich eubakterielle Molybdoenzyme. Neben den namensgebenden DMSO-Reduktasen gehören u.a. auch die dissimilatorischen NRs und die Formiatdehydrogenasen zu dieser Familie. Diese Molybdoenzyme fungieren unter anaeroben Bedingungen, insofern ihr Substrat vorliegt, als terminale Reduktasen. Sie zeichnen sich durch die bis-MPT-Guanin-Dinukleotid-Form des Moco aus, in der das Molybdän durch zwei Dithiolengruppen gebunden vorliegt. Ein fünfter Ligand wird durch eine Aminosäureseitenkette des umgebenden Polypeptids bereitgestellt, wobei es sich um ein Serin, ein Cystein oder ein Selenocystein handelt. Im oxidierten Zustand bildet eine labile Oxo- oder Hydroxygruppe einen sechsten Liganden
- Ausschließlich eukaryotische Vertreter weist die SO-Familie auf. Neben der SO umfasst sie die assimilatorischen NRs. Sie katalysieren den Transfer eines Sauerstoffatoms von oder zu einem freien Elektronenpaar. Das durch ein Dithiol gebundene Molybdän dieser Enzyme wird zusätzlich durch zwei Oxoliganden komplexiert, weshalb die Enzyme dieser Familie auch als Dioxo-Molybdoenzyme bezeichnet werden. Als fünfter Ligand fungiert die Seitenkette eines proteingebundenen Cysteins.
- Die Enzyme der XO-Familie schließlich katalysieren die Hydroxylierung von Aldehyden und heterozyklischen Aromaten und werden auch als echte Hydroxylasen bezeichnet, da der dem Substrat eingefügte Sauerstoff aus einem Wassermolekül stammt (Bray, 1975). Vertreter dieser Familie finden sich weit verbreitet sowohl unter Eubakterien als auch in Eukaryoten, wo sie u.a. durch die AOs und die Xanthinoxidoreduktasen (XOR) repräsentiert werden. Das aktive Zentrum dieser Enzyme besteht aus dem durch das Dithiol gebundene Mo, das durch drei weitere Liganden komplexiert wird. Dabei gibt es hier keinen Proteinliganden, sondern im aktiven Enzym neben einem Oxo- und einem Hydroxyliganden auch einen äquatorialen Sulfidoliganden, dessen Position im inaktiven Desulfo-Enzym ebenfalls durch einen Oxoliganden

besetzt ist. Nach der katalytisch aktiven Form werden diese Enzyme auch als Monooxo-Molybdoenzyme bezeichnet.



**Abb. 1-3: Liganden des Molybdäns bei den Familien der Molybdoenzyme.** A: Liganden der XO-Familie, neben einem apikalen Oxoliganden ist eine Sulfido- und eine Hydroxygruppe am Molybdän gebunden. B: SO-Familie, als Liganden bindet das Molybdän zwei Oxogruppen sowie einen proteineigenen Cystein-Schwefel. C: DMSO-Reduktase-Familie, zwei Dithiolengruppen binden das Molybdän, das zusätzlich einen Proteinliganden (Serin, Cystein oder Selenocystein) und im oxidierten Zustand noch einen Sauerstoff-, Schwefel- oder Selenidliganden bindet. (nach Hille, 1996 und 2006)

## 1.5 Der terminale Schwefel der Xanthinoxidase-Familie

Bereits vor der Beschreibung des Moco (Johnson *et al.*, 1980) wurde 1970 durch Massey und Edmondson festgestellt, dass aus Kuhmilch gereinigte XO durch die Behandlung mit Cyanid (CN<sup>-</sup>) inaktiviert werden kann. Hierbei kommt es zur Freisetzung eines Schwefelatoms, welches als Thiocyanat (SCN<sup>-</sup>) gebunden wird und quantitativ nachgewiesen werden kann. Es zeigte sich, dass die durch Cyanid inaktivierte XO durch Zugabe von Natriumsulfid und damit verbundener erneuter Inkorporierung des Schwefels zu großen Teilen reaktiviert werden kann. Coughlan *et al.* zeigten 1980, dass nicht alle Molybdoenzyme in gleicher Weise auf diese Cyanidbehandlung reagieren. So konnten die oxidierten Formen von SO und NR, im Gegensatz zur XO und AO, nicht durch Cyanidbehandlung inaktiviert werden, woraus geschlossen wurde, dass diese Enzyme keinen cyanolisierbaren katalytisch aktiven Schwefel aufweisen. In nachfolgenden Arbeiten wurde dann die chemische Natur dieses Schwefels ergründet. So nutzten Malthouse und Bray (1980) XO sowohl in der aktiven Sulfo- und in der inaktiven Desulfo- als auch in der durch [<sup>33</sup>S] resulfurierten Form für EPR-Spektroskopie. Sie konnten nachweisen, dass der cyanolisierbare Schwefel ein Ligand des Molybdäns ist und nicht als Persulfid vorliegt wie noch durch Massey und Edmondson favorisiert. Zum selben Schluss kamen fast zeitgleich Bordas *et al.* (1980), die mittels EXAFS-Analyse (extended x-ray absorption fine structure) CN<sup>-</sup>-inaktivierte XO mit einem Mischpool aus aktiver und



inaktiver XO verglichen. Sie postulierten in der inaktiven Form ein durch zwei Cystein- und einen Methioninschwefel komplexiertes Molybdän, das zusätzlich zwei terminale Oxogruppen als Liganden aufweist. Ihre Daten deuteten auf den Austausch einer dieser Oxo-Liganden durch einen terminalen Schwefelliganden im aktiven Enzym hin. Beide Arbeiten bestätigten damit Gutteridge *et al.*, die bereits 1978 eine (Enzym-Mo=S)-Gruppe in der aktiven XO und eine (Enzym-Mo=O)-Gruppe in der inaktiven XO angenommen hatten. Dieser terminale Schwefel der katalytisch aktiven XO wurde als Akzeptor für das vom Substrat transferierte Proton vorgeschlagen. Die inorganische Natur des cyanolisierbaren Schwefels wurde dann 1982 endgültig durch Wahl und Rajagopalan untermauert. Nach Einbau von radioaktiv markiertem [ $^{35}\text{S}$ ] in die Desulfo-XDH durch Sulfid und Dithionit wiesen sie nach, dass sich der Schwefel sowohl durch SDS als auch durch Guanidiniumchlorid aus dem Protein entfernen ließ. Sie zeigten, dass es sich dabei um einen „säurelabilen“ Schwefel handelt, der unter Bildung eines [ $^{35}\text{S}$ ]-Methylenblau-Komplexes aus der markierten XDH herausgelöst werden kann. Es blieb allerdings unklar, auf welche Weise und zu welchem Zeitpunkt dieser terminale Schwefel dem Molybdän angefügt wird.

Erste Hinweise auf einen enzymatischen Ursprung des terminalen Schwefels lieferten schließlich die Untersuchungen der *maroon-like* (*ma-l*)-Mutanten aus *Drosophila melanogaster*. Die Mutanten haben statt der üblichen hellroten eine kastanienbraune Augenfarbe, die auf das Fehlen des roten Augenpigments Drosopterin zurückzuführen ist und aus dem Ausfall der XDH-Aktivität resultiert. Biochemisch zeichnen sich die Mutanten sowohl durch den Aktivitätsverlust der AO (Courtright, 1967) und XDH (Forrest *et al.*, 1956; Glassman und Mitchell., 1959) als auch durch den Ausfall des bisher nur in *Drosophila* beschriebenen Molybdoenzyms Pyridoxaloxidase (Forrest *et al.*, 1961) aus. Alle diese Enzyme gehören zur XO-Familie der Molybdoenzyme und benötigen den terminalen Schwefel für ihre Aktivität. Die ebenfalls in *Drosophila* vorkommende SO ist in diesen Mutanten hingegen nicht betroffen (Bogaart und Bernini, 1981). Sie gehört jedoch zur SO-Familie der Molybdoenzyme, die für ihre Aktivität keinen terminalen Schwefel benötigt. Finnerty und Johnson stellten bereits 1979 fest, dass für die Aktivität von AO und XDH ein weiterer Genlocus, nämlich *ma-l*, verantwortlich ist und schlugen vor, dass es durch das Genprodukt zu einer post-translationalen Modifikation bei AO und XDH kommt. Warner und Finnerty wiesen für die *ma-l*-Mutante normale Moco-Mengen nach (1981) und konnten so eine Beeinträchtigung der Moco-Biosynthese ausschließen. 1982 konnten Wahl *et al.* dann zeigen, dass die *ma-l*-Mutanten tatsächlich in der Sulfurierung der Monooxo-Hydroxylasen defizient sind. Rohextrakte der *ma-l*-Mutanten wiesen einen hohen Level an Desulfo-Enzymen auf, die durch Zugabe von Dithionit und Sulfid resulfuriert und dadurch aktiviert werden konnten. Außerdem konnte inaktive XDH *in vitro* durch Wildtyp-Ma-I rekonstituiert werden. Somit

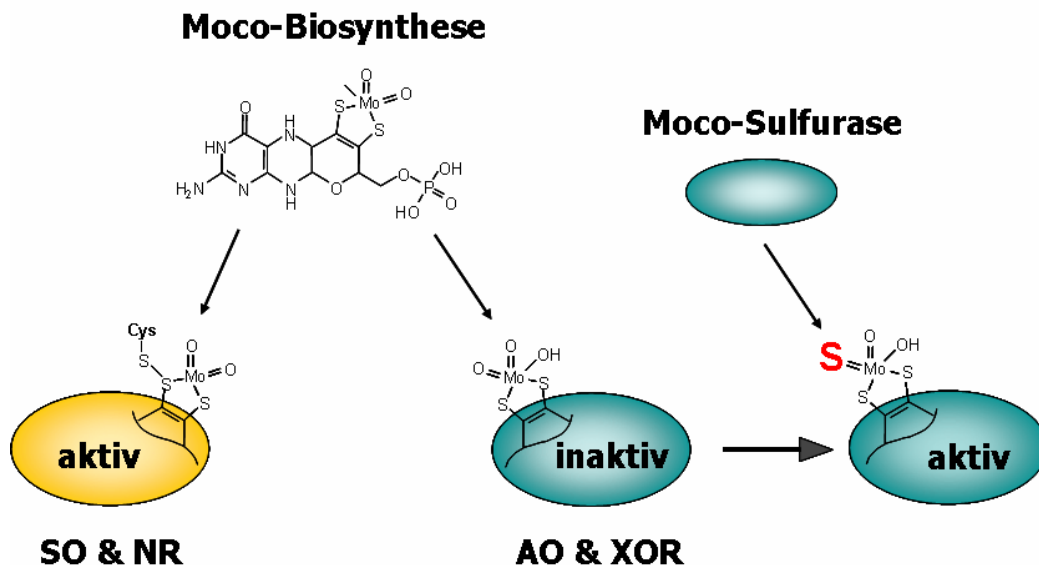
wurde gezeigt, dass die *ma-t*-Mutation die Inkorporation des terminalen Schwefels verhindert und der Nachweis erbracht, dass die Aktivierung der Monooxo-Hydroxylasen einer genetischen Kontrolle unterliegt. Die Funktion von Ma-I wurde als „cyanolyzable sulfur transferase“ beschrieben und es wurde als eine Möglichkeit vorgeschlagen, dass zunächst ein gemeinsamer Cofaktor in alle Molybdän-Enzyme inkorporiert wird. Die Biosynthese der Monooxo-Hydroxylasen benötigt demnach jedoch eine nachfolgende enzymatische Sulfurierung, so dass in Mutanten eine Akkumulierung der Desulfo-Form als Intermediat zu erwarten ist.

Ähnliche Eigenschaften wie die *ma-t*-Mutante zeigt die *hxB*-Mutante (hypoxanthine non-utilizer gene B) aus *Emericella nidulans*, die nicht mit Hypoxanthin oder Nicotinat als alleiniger Stickstoffquelle wachsen kann. Sie zeigt einen simultanen Ausfall der Monooxo-Molybdoenzyme Nicotinat-Hydroxylase und XDH (Scazzocchio, 1973). Die NR hingegen, ebenso wie die SO ein Dioxo-Molybdoenzym, zeigt in dieser Mutante eine normale Aktivität. Sowohl HxB als auch Ma-I sind also an der enzymatischen Sulfurierung des Moco in den Monooxo-Molybdoenzymen beteiligt und werden nach dieser Funktion als Moco-Sulfurasen bezeichnet (Abb. 1-4). Bei Komplementationsversuchen, die mit heteroallelen *ma-t* (Glassman und Pinkerton, 1960L; Chovnick *et al.*, 1969) und *hxB*-Mutanten (Hartley, 1970) durchgeführt wurden, konnte intragenische Komplementation erreicht werden. Daraufhin wurde postuliert, dass es sich bei den Moco-Sulfurasen um Proteine mit zwei oder mehr unabhängigen Domänen handelt (Amrani *et al.*, 2000).

Ein Defekt in der Moco-Sulfurierung ist ebenfalls bei Säugetieren bekannt und führt zu Xanthinurie Typ II. Es handelt sich hierbei um eine seltene autosomal-rezessive Erbkrankheit, die mit einem Ausfall von AO und XDH einhergeht. Die Symptome gehen dabei hauptsächlich auf den Aktivitätsverlust der XDH zurück. Hypoxanthin und Xanthin können nicht mehr zu Harnsäure abgebaut werden, so dass es zur Akkumulierung von Xanthin und in geringen Mengen von Hypoxanthin kommt, wohingegen der Harnsäuregehalt in Blutplasma und Urin sehr niedrig ist. Eine Folge ist die Ablagerung von Xanthinsteinen in den Nieren, was insbesondere bei Rindern zum Tod durch Nierenversagen führen kann. Watanabe *et al.* gelang 2000 die Entdeckung der verantwortlichen bovinen Mutation in einem *ma-t*-homologen Gen, welches als *mcsu* (molybdenum cofactor sulfurase) bezeichnet wurde.

Obwohl Prokaryonten ebenfalls Monooxo-Molybdoenzyme besitzen, die über einen terminalen Schwefel verfügen wie z.B. die Aldehydoxidoreduktase (*Desulfovibrio gigas*) oder die XDH (*Rhodobacter sp.*), wurden für sie weder Moco-Sulfurasen noch die entsprechenden Genloci beschrieben. Für die XDH aus *Rhodobacter* konnte hingegen ein alternativer Mechanismus der terminalen Sulfurierung gezeigt werden. Das Protein XdhC fungiert hierbei

als Moco-Insertase und inseriert bereits sulfurierten Moco in das Moco-freie XDH-Apoenzym (Neumann *et al.*, 2006).



**Abb. 1-4:** **Aktivierung der Monooxo-Hydroxylasen durch die Moco-Sulfurasen.** Der Moco wird zunächst in alle Molybdoenzyme inkorporiert, wodurch die Enzyme der SO-Familie sofort Aktivität erlangen. Die Enzyme der XO-Familie hingegen bleiben zunächst inaktiv und werden erst durch die Übertragung eines Schwefels durch die Moco-Sulfurasen aktiviert.

## 1.6 Die Moco-Sulfurasen HMCS und ABA3

Eine Mutation im Genlocus der humanen Moco-Sulfurase (*hmcs*) führt ebenfalls zu Xanthinurie Typ II, die phänotypisch der Mutation beim Rind sehr ähnlich ist, jedoch nur selten starke klinische Symptome aufweist. Neben den Xanthinsteinen in den Nieren kann es zu Muskelentzündungen und Krämpfen durch Ablagerungen von Xanthin im Muskelgewebe kommen (Ichida *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2003) oftmals verläuft die Krankheit jedoch auch völlig asymptomatisch. Der Ausfall der AO, die in Säugern u.a. die Oxidation von Retinal zu Retinolsäure katalysiert (Tomita *et al.*, 1993), scheint keine Symptome hervorzubringen. Betroffene Patienten können durch die Gabe von Allopurinol identifiziert werden, das sowohl durch AO als auch durch XDH zu Oxypurinol umgesetzt wird und im Urin nachgewiesen werden kann (Reiter *et al.*, 1990). Im Gegensatz zu Patienten mit einer Mutation im *xdh*-Genlocus (Xanthinurie Typ I), die ebenfalls reduzierte Harnstoffmengen und eine Akkumulation des Xanthins aufweisen, kommt es bei diesen Patienten zu keiner Oxypurinol-Bildung. Auf Basis dieses Routinescreenings erfolgte die Isolierung des *hmcs*-Gens 2001 durch Ichida *et al.* Mittlerweile wurden zahlreiche *hmcs*-Mutationen beschrieben (Ichida *et*

*al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2003; Peretz *et al.*, 2007), bei denen stets ein Ausfall der AO- und XDH-Aktivität ohne Beeinträchtigung der SO-Aktivität beobachtet wurde.

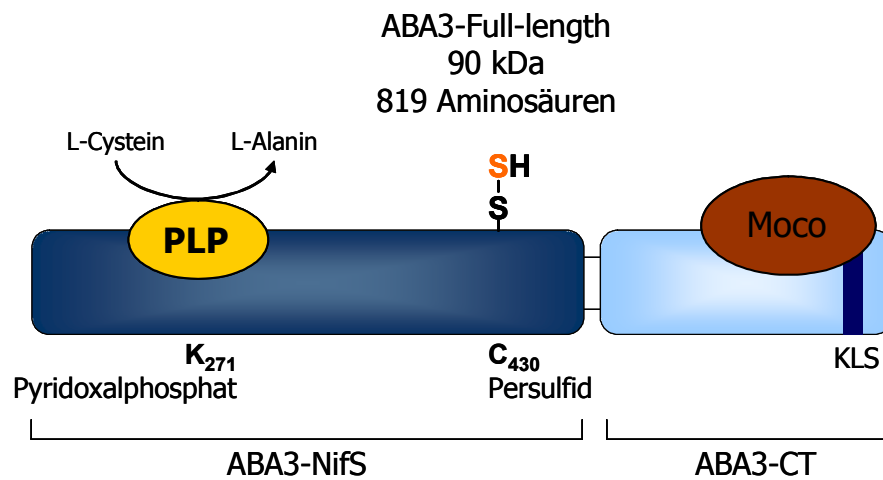
Pflanzliche Mutanten mit einem Defekt in der Moco-Sulfurierung sind ebenfalls durch einen simultanen Ausfall von XDH und AO bei gleichzeitigem Erhalt der NR- und SO-Aktivität charakterisiert. Im Gegensatz zu den Säugern ist der Phänotyp hier jedoch hauptsächlich auf den Ausfall der AO zurückzuführen, woraus ein Abscisinsäure (ABA)-defizienter Phänotyp resultiert. Der Hauptweg der Biosynthese des Pflanzenhormons ABA über die Vorstufe Abscisinaldehyd wird im letzten Schritt durch AO katalysiert. Da die Regulation des Wasserhaushaltes über die Stomata durch ABA in den Mutanten gestört ist, zeigen die Pflanzen einen welken Habitus und verminderte Stresstoleranz. Außerdem zeigen sie eine verkürzte Samenruhe. Durch zwei alternative Stoffwechselwege, die zur Biosynthese von ABA über die Intermediate Xanthoxin und Abscisinalkohol führen, kann die Pflanze überleben (Seo und Koshiba, 2002). Allerdings ist unter Stressbedingungen die Expression vieler Stressresistenz-vermittelnder Gene abhängig von einer Erhöhung des basalen ABA-Gehaltes (Chandler und Robertson, 1994). Eine Anpassung der *aba3*-Mutanten an Stressbedingungen ist dadurch nicht möglich. Dies manifestiert sich durch das Fehlen von Kältetoleranz (Gilmour und Tomashow, 1991; Heino *et al.*, 1990) und Austrocknungs-Resistenz (Vartanian *et al.*, 1994). Diese Moco-Sulfurase-Defizienz wurde bisher für die *aba3*-Mutante aus *A.thaliana* (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1997), die *flacca*-Mutante aus *Lycopersicon esculentum* (Marin und Marion-Poll, 1997; Sagi *et al.*, 2002) und für die *aba1*-Mutante aus *Nicotiana plumbaginifolia* (Parry *et al.*, 1991; Leydecker, 1995) beschrieben.

Basierend auf Homologien zu *ma-I* und *hxB* konnten Bittner *et al.* 2001 *aba3* als erstes pflanzliches Gen einer Moco-Sulfurase identifizieren und die cDNA aus *A.thaliana* isolieren. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinant exprimiertes ABA3 in einem *in vitro*-System in der Lage ist, AO in Anwesenheit des Substrates L-Cystein direkt zu aktivieren. ABA3 liegt als Homodimer mit einer Gesamtgröße von 180 kDa vor. Jedes Monomer lässt sich aufgrund von Homologieuntersuchungen in zwei Domänen unterteilen (Abb. 1-5). Die NH<sub>2</sub>-terminale Domäne weist signifikante Homologien zur Cystein-Desulfurase NifS aus *Azotobacter vinelandii* und anderen NifS-ähnlichen Proteinen auf und wird deshalb als NifS-ähnliche-Domäne (ABA3-NifS) bezeichnet. NifS-Proteine erfüllen ihre Funktion als L-Cystein-Desulfurasen und sind üblicherweise am Aufbau von Fe-S-Clustern beteiligt, indem sie den dafür benötigten Schwefel bereitstellen. Durch den Vergleich von Aminosäuresequenzen und Eigenschaften der NifS-ähnlichen L-Cystein-Desulfurasen konnten diese in zwei Klassen unterteilt werden (Mihara *et al.*, 1997). Zu den Enzymen des Typs I zählen die NifS/IscS-Proteine, wohingegen die SufS-Proteine zur Gruppe der Typ II-Enzyme gehören. ABA3-gruppert mit den SufS-ähnlichen Enzymen des Typs II. Es konnte gezeigt werden, dass auch

ABA3-NifS als Cystein-Desulfurase fungiert und in einer Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängigen Reaktion L-Cystein zu L-Alanin umsetzt (Heidenreich *et al.*, 2005). Der so freigesetzte Schwefel wird als Persulfid auf einen konservierten Cysteinrest (C430) übertragen. Die Mutagenisierung dieses Cysteins führt zu einem ~80%igen Verlust der Cystein-Desulfuraseaktivität. Die Bindung des Cofaktors PLP erfolgt an ein strikt konserviertes Lysin (K271). ABA3-NifS weist neben der L-Cystein-Desulfurase-Aktivität auch eine Selenocystein-Lyase-Aktivität auf und kann neben L-Cystein auch L-Selenocystein als Substrat verwenden. Das separat rekombinant exprimierte ABA3-NifS ist in der Lage, sowohl die Cystein-Desulfurierung als auch die Sulfurierung des Moco von AO und XDH alleine auszuführen. Dies zeigt, dass beide Hauptfunktionen der Moco-Sulfurase ABA3 grundsätzlich ausschließlich durch ABA3-NifS übernommen werden können und die C-terminale Domäne zumindest *in vitro* keine essentielle Bedeutung hat (Heidenreich *et al.*, 2005). Die Dimerisierung des Full-Length Proteins (ABA3-FL) wird durch ABA3-NifS vermittelt, das somit ebenfalls ein Dimer mit einer Größe von 110 kDa bildet. Die 35 kDa große C-terminale Domäne von ABA3 (ABA3-CT) liegt hingegen als Monomer vor.

Die C-Termini der Moco-Sulfurasen weisen ebenfalls große Homologien untereinander auf. Allerdings konnten über die genaue Funktion der C-Termini bei der Moco-Sulfurierung bisher nur unterschiedliche Vermutungen aufgestellt werden. Zunächst wurde ihnen eine Rolle bei der Erkennung der Zielproteine AO und XDH zugeschrieben (Amrani *et al.*, 2000). Der Moco wird vor der terminalen Sulfurierung in die eukaryotischen Monooxo-Molybdoenzyme inkorporiert, so dass die korrekten Zielproteine durch die Moco-Sulfurase identifiziert werden müssen. Da ABA3-CT Aminosäuresequenz-Motive aufweist, die auf eine Bindung von Fe-S-Clustern hindeuten, wurde vorgeschlagen, dass die Zielproteine durch die C-Termini anhand der Eisen-Schwefel-Cluster identifiziert werden können, die von den Enzymen der XO-Familie als prosthetische Gruppe gebunden werden (Bittner *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu weisen die Enzyme der SO-Familie keine Fe-S-Cluster auf. Basierend auf Datenbankanalysen ordneten Anantharaman und Aravind (2002) die Moco-Sulfurase-C-Termini in eine neue Domänen-Superfamilie ein, die MOSC-Domänen (molybdenum cofactor sulfurase C-terminal domain). Sie postulierten eine wichtige Rolle der MOSC-Domänen bei der Bildung verschiedener Metall-Schwefel-Cluster. Unter Beteiligung eines hochkonservierten Cysteinrestes (C758 in ABA3-CT) sollte die MOSC-Domäne den dafür benötigten Schwefel von der NifS-ähnlichen-Domäne übernehmen und auf ein Zielprotein übertragen. Die Beteiligung der C-terminalen Domäne an der Aktivierung von AO und XDH konnte 2002 erstmals durch die Charakterisierung der *flacca*-Mutation in Tomate gezeigt werden (Sagi *et al.*). Die Pflanze weist den üblichen welken Habitus von Moco-Sulfurase-Mutanten auf. Sie ist durch einen Aktivitätsverlust von AO und XDH im Spross und der Reduktion dieser

Aktivitäten in den Wurzeln gekennzeichnet. Die zugrunde liegende Mutation ist die Deletion zweier benachbarter Arginine (R777 und R778) im C-Terminus von Flacca sowie der Austausch eines Alanins (A779) durch ein Threonin. Untermauert wurde diese Bedeutung des C-Terminus für die Moco-Sulfurierung durch die *aba3/sir3-3*-Mutante aus *A. thaliana*, die durch ein Sirtinol-Screening von Dai *et al.* 2005 identifiziert wurde. Durch die Gabe des synthetischen Auxin-Derivats, Sirtinol wird bei Wildtyp-Pflanzen eine Auxin-abhängige Antwort induziert. Einen wichtigen Schritt stellt hierbei die Umwandlung von HNA (2-hydroxy-1-naphthaldehyde) zu HNC (2-hydroxy-1-naphtoic acid) dar, der durch AO katalysiert wird. Dai *et al.* suchten Sirtinol-resistente Pflanzen und isolierten somit sowohl Pflanzen mit Defekten in der Moco-Biosynthese als auch in der terminalen Sulfurierung, da in diesen Fällen ein Ausfall der AO-Aktivität erfolgt. Bei einer dieser Mutanten war ein konserviertes Arginin in ABA3-CT (Position 723) gegen ein Lysin ausgetauscht. Interessanterweise ist das gleiche Arginin in HMCS-CT (hier Position 776) bei Patienten mit Xanthinurie Typ II betroffen (Peretz *et al.*, 2007). Alle diese Mutationen zeigen, dass ABA3-CT *in vivo* eine essentielle Rolle bei der Aktivierung der Monooxo-Hydroxylasen zukommt. Eine weitere mögliche Funktion für ABA3 ergibt sich aus der Primärsequenz: Im Gegensatz zu anderen Moco-Sulfurasen weist ABA3-CT ein offensichtliches Kernlokalisierungssignal auf (bipartite Nuclear Localization Signal) auf. Da zusätzlich einige Transkriptionsfaktor-Signaturen in der Primärsequenz von ABA3 wie ein „TFIIB“-Motiv, eine Myc-type helix-loop-helix Dimerisierungsdomäne sowie ein „Zink-Finger“ DNA-Bindemotiv vorliegen, wird eine zusätzliche Rolle von ABA3 als Transkriptionsfaktor vermutet, die bei der Induktion einer ABA3-abhängigen Stressantwort von Bedeutung sein könnte (Bittner *et al.*, 2001). Dies wird durch die Beobachtung untermauert, dass sowohl das Full-Length-Protein als auch beide Domänen einzeln im Nucleus lokalisiert sein können (Bittner *et al.*, unveröffentlichte Daten). Insbesondere der separat exprimierte ABA3-CT zeigt eine ausgeprägte Kernlokalisierung. 2003 konnte erstmals der Nachweis einer Moco-Bindung an ABA3-CT erbracht werden (eigene Diplomarbeit), inwiefern diese Bindung jedoch eine Funktion bei der Aktivierung der Monooxo-Hydroxylasen übernimmt oder eventuell ein Signal für den Kerntransport darstellt, konnte bisher nicht geklärt werden.



**Abb. 1-5:** **Die Moco-Sulfurase ABA3.** Das Protein unterteilt sich in eine NH<sub>2</sub>-terminale Domäne mit starken Homologien zu NifS-ähnlichen Proteinen und eine C-terminale Moco-bindende Domäne mit bisher unbekannter Funktion. ABA3-NifS enthält ein stark konserviertes Lysin (K271, Pyridoxalphosphat (PLP)-Bindestelle) und ein konserviertes Cystein (C430, Persulfid-Bindestelle). ABA3-CT weist ein Kernlokalisierungssignal (KLS) auf. ABA3 liegt als Homodimer vor.

## **2 Ergebnisse**

### **2.1 Charakterisierung von ABA3-CT**

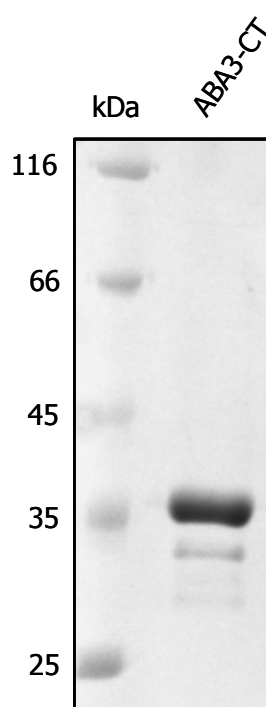
#### **2.1.1 Expressionsbedingungen und Aufreinigung von ABA3-CT**

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass ABA3-CT grundsätzlich in der Lage ist, Moco und/oder MPT zu binden (eigene Diplomarbeit, 2003). Die erstmalige Bindung des Cofaktors konnte über das fluoreszierende saure Oxidationsprodukt FormA nachgewiesen und quantifiziert werden. Allerdings lag der Cofaktorgehalt des damals exprimierten ABA3-CT nur bei 0,8-1 mmol/mol ABA3-CT, so dass eine unspezifische Bindung des Cofaktors an ABA3-CT nicht ausgeschlossen werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte keine weitere Charakterisierung des gebundenen Cofaktors, insbesondere wurde auch keine Unterscheidung zwischen gebundenem MPT oder Moco vorgenommen. Als erstes Ziel der vorliegenden Arbeit sollten somit die Expressionsbedingungen von ABA3-CT in Bezug auf eine möglichst hohe Cofaktorsättigung optimiert und eine spezifische Bindung von Moco/MPT an ABA3-CT verifiziert werden. ABA3-CT konnte unter den bis dahin genutzten Expressionsbedingungen bei 37 °C in großen Mengen von bis zu 60-80 mg/L Expressionskultur erhalten werden. Diese schnelle Expression hat jedoch den Nachteil, dass die aufwändige Biosynthese des Moco möglicherweise nicht in gleichem Maße erfolgen kann wie die des ABA3-CT. Auffällig war zudem, dass der bei 22 °C exprimierte ABA3-CT im Gegensatz zu dem bei 37 °C exprimierten ABA3-CT eine deutliche Braunfärbung aufwies, die auf eine stärkere Bindung des Moco zurückgehen könnte. Um eine schwächere Expression des ABA3-CT bei gleichzeitig stärkerer Cofaktorbeladung zu erhalten, wurden die Expressionsbedingungen grundlegend geändert. Die Expression erfolgte im *E. coli* Expressionsstamm TP1000. Dieser Stamm ist durch eine Mutation im *moba*-Gen charakterisiert, wodurch die Synthese der prokaryotischen MGD-Form des Moco verhindert wird (Palmer, 1996), so dass die eukaryotische Form des Moco akkumuliert wird. Zur Unterstützung der Moco-Biosynthese wurde 1 mM Molybdat zur Expressionskultur gegeben. Mit kleinen Expressionsansätzen von je 50 ml wurde eine weitere Optimierung der Cofaktorbeladung versucht, indem IPTG-Konzentrationen von 100 pM–15 µM bei einer OD<sub>600</sub> von 0,1 und 0,3 bei Induktion getestet wurden. Ebenfalls wurde untersucht, ob eine Veränderung der Expressionszeit zu besserer Beladung mit Cofaktor führt. Jeweils 5 ml der Expressionsansätze wurden aufgeschossen und nach Aufreinigung auf die FormA-Menge hin untersucht. Als optimal erwies sich eine Induktion mit 15 µM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0,1 und eine Expressionszeit von 20–24 h. Längere Expressionszeiten führten wieder zu einer



abnehmenden Cofaktorbeladung und höhere IPTG-Konzentrationen erhöhten die Proteinexpression deutlich bei gleichzeitig schwächerer Cofaktorbeladung.

Die nachfolgenden Großkulturen wurden im Verhältnis von 1:200-1:300 mit ÜN-Kulturen von frisch transformierten TP1000 angeimpft und die Expression in 2- oder 3L-Kolben erfolgte aerob bei 22 °C für 20 h unter Schütteln (80–100 rpm). Die Zellpellets wurden bis zur Aufarbeitung bei -70 °C eingefroren und die Zellen mittels French-Press und Sonifizieren aufgeschlossen. Die Aufreinigung des mit einem NH<sub>2</sub>-terminalen 6xHis-Tag versehenen ABA3-CT aus dem erhaltenen Lysat erfolgte über eine Ni-Nitrilo-tris-Acetat- (NTA)-Matrix. Die Elution des ABA3-CT konnte anhand der charakteristischen bräunlichen Farbe des Proteins verfolgt werden. Das eluierte Protein zeigte im SDS-Gel nach Coomassie-Färbung eine nahezu reine Bande von etwa 36 kDa, was der Größe von ABA3-CT entspricht (Abb. 2-1). Bereits nach diesem affinitätschromatographischen Reinigungsschritt lag das Protein also bereits in überraschend reiner Form vor. Die Konzentration des aufgereinigten rekombinant exprimierten Proteins lag bei 5-15 mg/L Expressionskultur. Der so erhaltene ABA3-CT konnte für weitere Analysen eingesetzt werden. Als problematisch erwies sich jedoch die Instabilität von ABA3-CT. Das Umpuffern in Puffer mit pH-Bereichen von 8 und höher führte ebenso zu starker Präzipitation des Proteins wie die Inkubation bei RT. Das Protein wurde daher zunächst im 250 mM Imidazol-enthaltenden Elutionspuffer belassen, in dem es eine gute Stabilität zeigte, und unmittelbar nach der Reinigung direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle nachfolgenden Versuche wurden soweit möglich bei 4 °C und in Hochsalzpuffern durchgeführt und für alle Versuche wurde stets frisches Protein verwendet.



**Abb. 2-1: SDS-PA-Gelanalyse des ABA3-CT nach affinitätschromatographischer Aufreinigung.** 10 µg des affinitätschromatographisch aufgereinigten ABA3-CT wurden auf ein 12 %iges SDS-PA-Gel aufgetragen. Nach der Coomassie-Färbung ist eine dominante Bande bei etwa 36 kDa angefärbt.

### 2.1.2 FormA-Analyse

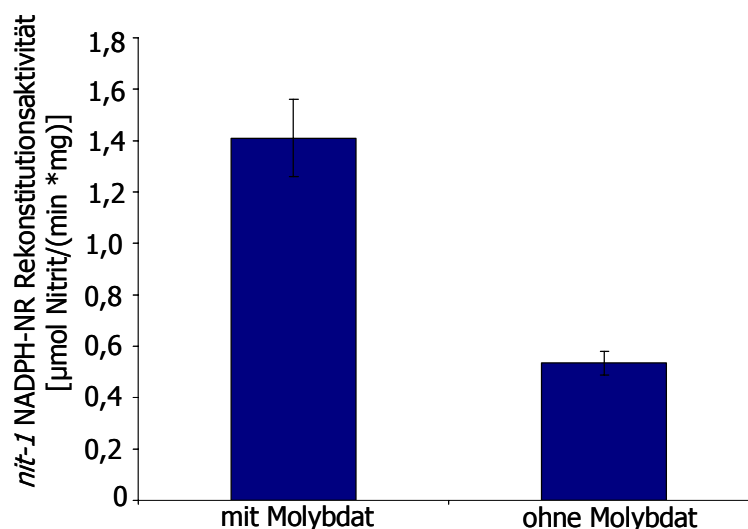
Nach Anpassung der Expressionsbedingungen im Hinblick auf eine gute Cofaktorsättigung wurde zunächst die Gesamtcofaktormenge durch den Nachweis von FormA an ABA3-CT aus mehreren voneinander unabhängigen Expressionsansätzen quantifiziert. Je Expressionsansatz wurde in Doppelbestimmung 5-10 µl des Ni-NTA-aufgereinigten Proteins durch saure I<sub>2</sub>/KI-Lösung oxidiert, das entstandene FormA durch Dephosphorylierung in FormA-dephospho umgewandelt und über isokratische Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigt (4.4.17). 50 µl des Eluats wurden anschließend für die HPLC-Analytik eingesetzt und FormA-dephospho mit einer Retentionszeit von etwa 5-6 min quantifiziert. Die Umrechnung der erhaltenen Cofaktormenge auf die eingesetzte Proteinmenge zeigte eine durchschnittliche Cofaktorbeladung von 0,35 mol FormA/mol ABA3-CT (Tab. 2-1). Eine solche Cofaktorbeladung konnte definitiv als spezifisch angesehen werden und sollte im Folgenden näher untersucht werden.

### 2.1.3 Biologischer Nachweis von Moco/MPT durch den *nit-1*-Assay

Die *nit-1*-Mutante aus *Neurospora crassa* zeigt einen Defekt im MPT-Synthase/Sulfurylase-Komplex, so dass sie durch die Akkumulation der MPT-Vorstufe cPMP charakterisiert ist (Nason *et al.*, 1971). Zellfreie Extrakte dieser Mutante weisen eine Moco-freie inaktive Apo-NR auf, die jedoch durch Zugabe einer exogenen Moco-Quelle rekonstituiert werden kann. Der *nit-1*-Assay stellt somit einen biologischen Nachweis für aktiven Moco dar. Eine Rekonstitution der NADPH NR-Aktivität ist nur durch intakten Moco möglich, MPT kann nicht nachgewiesen werden. Wird dem *nit-1*-Rekonstitutionsansatz jedoch Molybdat zugesetzt, wird MPT chemisch zu Moco konvertiert und führt ebenfalls zu einer Rekonstitution der Apo-NR, so dass sowohl Moco als auch MPT im Ansatz erfasst werden. Über die Molybdataabhängigkeit der Rekonstitution kann somit eine qualitative Aussage über das Vorhandensein von Moco und/oder MPT in der verwendeten Cofaktorquelle gemacht werden. Mit ABA3-CT wurden Komplementationsversuche sowohl mit als auch ohne Zugabe von Molybdat gemacht. In einer Dreifachbestimmung wurden je Ansatz 0,5 µg Ni-NTA-aufgereinigter ABA3-CT zur Freisetzung des Cofaktors hitzedenaturiert und nach Abkühlen mit *nit-1*-Extrakt versetzt. Zusätzlich enthielt der Ansatz 4 mM reduziertes GSH und, wo erforderlich, 10 mM Molybdat. Die Rekonstitution erfolgte anaerob für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C. Der Nachweis der NADPH-NR Aktivität erfolgte wie unter 4.4.16 beschrieben.

Jeder *nit-1*-Extrakt weist unterschiedliche Mengen an Apo-NR auf und zeigt somit unterschiedlich starke NR-Rekonstitution. Zur Bestimmung der Komplementationsraten in  $\mu\text{mol Nitrit}/(\text{min} \cdot \text{mg ABA3-CT})$  musste zunächst eine Kalibriergerade erstellt werden, über deren Formel die gebildeten Mengen an Nitrit bestimmt werden konnten. Hierzu wurden in Dreifachbestimmung Ansätze mit Nitrit-Konzentrationen von 5-50  $\mu\text{M}$  bei 540 nm vermessen. Aus den erhaltenen Absorptionswerten ergab sich mit einem Korrelationswert von 0,999 eine Regressionsgerade mit der Formel  $y = 0,0359x - 0,1343$ . Der lineare Bereich für diese Kalibriergerade lag bei einer  $\text{OD}_{540}$  von 0,03 bis 1,63 (siehe Anhang).

Wie aus Abbildung 2-2 hervorgeht, war ABA3-CT sowohl mit als auch Zugabe von Molybdat zur NADPH NR-Rekonstitution in der Lage. Im Molybdat-freien Ansatz kommt es zur Bildung von  $0,53 \pm 0,046 \mu\text{mol Nitrit}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  und nach Zugabe von Molybdat wurden  $1,41 \pm 0,15 \mu\text{mol Nitrit}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  umgesetzt. Dies zeigt, dass ABA3-CT sowohl Moco als auch das Molybdän-freie MPT bindet. Eine Quantifizierung dieses Verhältnisses ist durch den *nit-1*-Assay nicht möglich. Da jedoch die Rekonstitutionsrate des Ansatzes ohne Molybdatzugabe nahezu 40 % der Gesamtreakonstitution durch Moco und MPT ausmacht, kann von einer signifikanten Moco-Bindung ausgegangen werden.



**Abb. 2-2:** NADPH NR-Rekonstitution im *nit-1*-Assay durch ABA3-CT. Gezeigt ist die *nit-1*-Rekonstitutionsrate in  $\mu\text{mol Nitrit}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  durch ABA3-CT sowohl mit Zugabe von 10 mM Molybdat als auch ohne Molybdatzugabe ( $n = 3$ ).

#### 2.1.4 Molybdän-Bestimmung über Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry

Durch die Molybdat-unabhängige NADPH NR-Rekonstitution im *nit-1*-Assay konnte gezeigt werden, dass ABA3-CT Moco bindet. Ebenso konnte aber auch ausgeschlossen werden, dass

ausschließlich Moco gebunden wird, da eine deutliche Aktivitätssteigerung durch die Molybdatzugabe erreicht wurde. Um die Menge an gebundenem Moco quantifizieren zu können, wurde am Institut für Umwelt-Geologie der Technischen Universität Braunschweig (Prof. Dr. D. Zachmann und C. Kraft) eine Molybdänbestimmung mittels Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS; dt.: Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma) am Ni-NTA-aufgereinigten ABA3-CT vorgenommen. In Bezug auf die eingesetzte Proteinmenge konnte dadurch eine Aussage über die Menge an Molybdän und damit an Moco pro mol ABA3-CT gemacht werden. Außerdem kann der Anteil des Moco am zuvor bestimmten FormA-Gehalt und damit an der Gesamtcofaktormenge ermittelt werden. Für ABA3-CT wurden 0,26 mol Molybdän/mol Protein bestimmt. Dies entspricht einem Moco-Anteil von etwa 70 % am gebundenen Cofaktor (Tab. 2-1).

**Tab. 2-1: Charakterisierung des Cofaktors an ABA3-CT.** Gezeigt sind die Anteile unterschiedlicher Cofaktor-Subspezies, die an rekombinant exprimiertem ABA3-CT gebunden vorliegen. Die MPT-Saturierung bezieht sich auf die Gesamt-Proteinmenge, der Moco-Anteil auf die Gesamtcofaktormenge und der Anteil an sulfuriertem Moco steht in Bezug zum Gesamt-Moco. (FormA-Gehalt: n = 8; Molybdängehalt: n = 2; Thiocyanat-Bestimmung: n = 4).

FormA-Gehalt	Molybdängehalt	Thiocyanat
0,35 ± 0,058 [mol/mol Protein]	0,25 ± 0,02 [mol/mol Protein]	0,16 ± 0,052 [mol/mol Protein]
35 % MPT-Saturierung	70 % Moco	64 % sulfurierter Moco

### 2.1.5 Bestimmung des terminalen Schwefels am Moco von ABA3-CT

Durch die FormA-Analyse und den *nit-1*-Assay ohne Molybdatzugabe konnte MPT/Moco nachgewiesen werden und der molybdänfreie *nit-1*-Assay sowie die Molybdänbestimmung über ICP-MS zeigten die Bindung des aktiven Moco an ABA3-CT. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, ob der an ABA3-CT gebundene Moco ebenso wie die Zielproteine der Moco-Sulfurasen, XDH und AO, einen terminalen cyanolisierbaren Schwefel aufweist. Durch den Nachweis des cyanolisierbaren Schwefels sollte der Anteil an sulfuriertem Moco bestimmt werden. Der terminale Schwefel wurde durch Cyanid abgespalten und das entstehende Thiocyanat durch Zugabe eines Eisen-Nitrat-haltigen Reagenz (Sörbos Reagenz) in einen rötlichen Thiocyanat-Eisen-Komplex überführt, der bei einer Wellenlänge von 460 nm photometrisch quantifiziert werden kann. Um das Abspalten anderer möglicherweise am

ABA3-CT gebundener Schwefel, wie z.B. Persulfidschwefel, durch Cyanid zu verhindern, wurde das Protein vor der Cyanidbehandlung mit dem Reduktionsmittel TCEP inkubiert. Hierdurch sollten andere Schwefelquellen außer dem terminalen Schwefel eliminiert und somit eine Verfälschung des Thiocyanat-Nachweises ausgeschlossen werden. Nach Erstellen einer Thiocyanat-Kalibriergeraden mit KSCN konnte die freigesetzte Menge an terminalem Schwefel quantifiziert und in Bezug zur zuvor ermittelten Protein- und FormA-Menge gesetzt werden. Für ABA3-CT lag der Anteil an cyanolisierbarem Schwefel bei durchschnittlich 0,16 mol SCN/mol Protein. Somit liegen am rekombinant exprimierten ABA3-CT 64 % des gebundenen Moco in der sulfurierten Form vor (Tab. 2-1).

### 2.1.6 Molybdatfreie Expression von ABA3-CT

Um den Einfluss des zur Expressionskultur zugegeben Molybdats auf die Moco-Biosynthese und damit auch auf die Cofaktorsättigung an ABA3-CT zu untersuchen, wurde Protein in Abwesenheit von Molybdat exprimiert. Für den so exprimierten ABA3-CT erfolgte ebenfalls der FormA-Nachweis zur Bestimmung der Gesamtcofaktormenge und der *nit-1*-Assay sowohl mit als auch ohne Molybdatzugabe zum Nachweis des aktiven Moco. Ebenso erfolgte die Molybdänbestimmung über ICP-MS sowie die Quantifizierung cyanolisierbaren Schwefels.

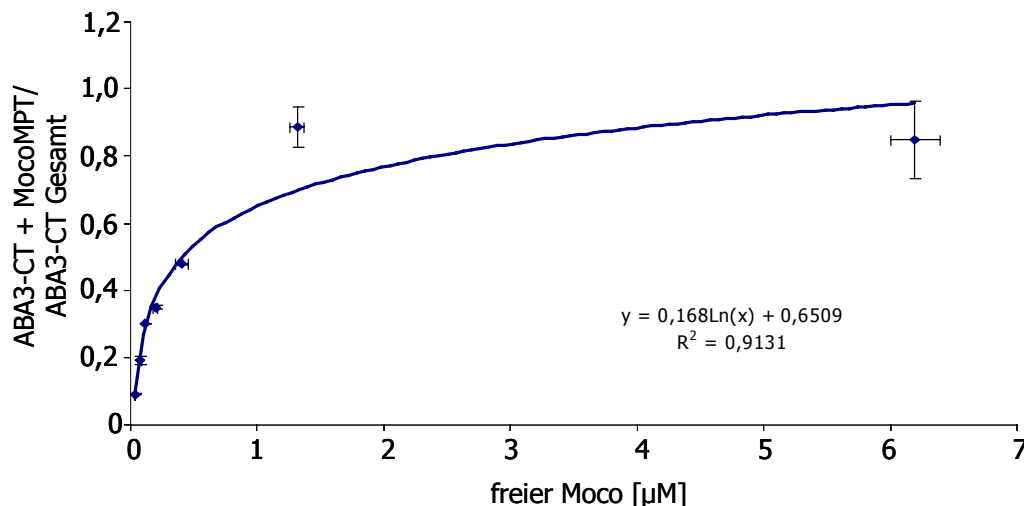
Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied sowohl in der Gesamtcofaktorbeladung als auch beim prozentualen Anteil von Moco an der Cofaktormenge (Tab. 2-2). Die FormA-Analyse zeigte, dass lediglich 10 % des Proteins Cofaktor gebunden hatte, wovon wiederum nur 13 % durch Moco repräsentiert wurden. Terminaler Schwefel in Form von Thiocyanat konnte für den so exprimierten ABA3-CT nicht nachgewiesen werden. Die Menge an möglicherweise entstandenem Thiocyanat lag unterhalb der Nachweisgrenze, die bei dieser Bestimmung bei einem theoretischen Anteil von 46 % sulfuriertem Moco lag. Somit liegt der tatsächliche Anteil sulfurierten Cofaktors auf jeden Fall unter 46 % und damit deutlich niedriger als bei der Expression mit Molybdatzugabe. Der niedrige Prozentsatz von Moco an der Gesamtcofaktormenge spiegelte sich auch in den Ergebnissen des *nit-1*-Assays wider. Die Absorptionswerte lagen für die Molybdat-unabhängige Rekonstitution an der Nachweisgrenze des Assays und mit einer durchschnittlichen OD<sub>460</sub> von 0,006 weit unter dem für diesen Assay linearen Absorptionsbereich (siehe 2.1.3). Nach Molybdatzugabe konnte eine Rekonstitutionsrate von  $0,94 \pm 0,16 \mu\text{mol Nitrit}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  erreicht werden, die damit deutlich niedriger lag als die unter 2.1.3 erhaltenen Rekonstitutionsraten und die schwächere Cofaktorsättigung untermauerte.

**Tab. 2-2: Cofaktorbindung an ABA3-CT nach Expression ohne Molybdatzugabe.**  
Gezeigt sind die Anteile unterschiedlicher Cofaktor-Subspezies, die an ABA3-CT gebunden vorliegen. Die MPT-Saturierung bezieht sich auf die Gesamt-Proteinmenge und der Moco-Anteil auf die Gesamtcofaktormenge. ND = die Menge an gebildetem Thiocyanat lag unter der Nachweisgrenze (0,45 nmol SCN<sup>-</sup>; hier unter 0,6 % der eingesetzten Proteinmenge; FormA-Gehalt: n = 3; Molybdängehalt: n = 2; Thiocyanat-Bestimmung: n = 3).

FormA-Gehalt	Molybdängehalt	Thiocyanat
0,104 ± 0,013 [mol/mol Protein]	0,014 ± 0,001 [mol/mol Protein]	ND
10 % MPT-Saturierung	13 % Moco	ND

### 2.1.7 Bestimmung des $K_D$ -Wertes für Moco an ABA3-CT

Um den  $K_D$ -Wert von Moco am ABA3-CT bestimmen zu können, wurde zunächst Moco-freier ABA3-CT benötigt. Hierzu wurde das Protein im *E. coli*-Expressionsstamm RK5204 exprimiert, der weder Moco noch das Intermediat MPT synthetisieren kann und cPMP akkumuliert. Als Moco-Quelle diente im *E. coli* Expressionsstamm TP1000 rekombinant exprimiertes Moco Carrier Protein (MCP) aus *Chlamydomonas reinhardtii*, das ausschließlich Moco, aber kein MPT bindet (Fischer *et al.*, 2006). MCP wurde bei 90 °C hitzedenaturiert, um den gebundenen Cofaktor herauszulösen. Zu 10 µM des Cofaktor-freien ABA3-CT wurden in Doppelbestimmung steigende Mengen des aus MCP herausgelösten Cofaktors gegeben und bei 4 °C für 15 min coinkubiert. Als Kontrolle wurden Protein-freie Ansätze mitgeführt. Freier Moco wurde anschließend durch Ultrazentrifugation über einen Konzentrator (10 kDa MWCO) abgetrennt. Die Moco-haltigen Durchbrüche wurden anschließend sofort zu FormA oxidiert und die Menge ungebundenen Cofaktors über HPLC-Analyse bestimmt. Die Menge des an ABA3-CT gebundenen Cofaktors konnte über die Differenz zwischen ungebundenem Cofaktor und der Gesamtcofaktormenge ermittelt werden. Da die ABA3-CT-Konzentration bekannt war, konnte der Anteil an Moco-haltigem ABA3-CT an der Gesamt-Proteinmenge in jedem Ansatz bestimmt und gegen die Konzentration an freiem Moco aufgetragen werden (Abb. 2-3). Hieraus ließ sich nach Regression der  $K_D$ -Wert ableiten, der für die Bindung von Moco bei durchschnittlich 0,55 µM lag.



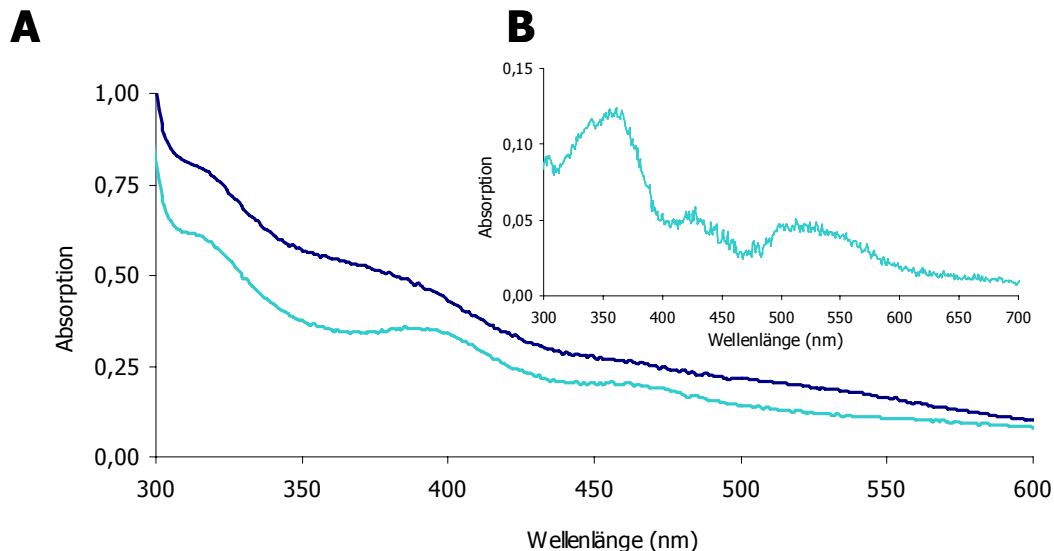
**Abb. 2-3: Bindung von Moco an ABA3-CT.** Ungebundener Moco wurde mittels Ultrazentrifugation durch einen 10 kDA MWCO-Konzentrator von ABA3-CT getrennt. Die Moco-Konzentration wurde durch die Oxidation zu FormA quantifiziert (n = 2).

### 2.1.8 Spektrale Eigenschaften von ABA3-CT

Der unter den zuvor beschriebenen Standardbedingungen rekombinant exprimierte und aufgereinigte ABA3-CT zeichnete sich durch eine intensive Braunfärbung aus, die offenbar auf gebundenen Moco/MPT zurückzuführen ist. Um das spezifische Absorptionsverhalten des Moco-beladenen Proteins zu analysieren, wurde ein UV/VIS-Spektrum im Wellenlängenbereich von 200–900 nm aufgenommen. Im Wellenlängenbereich bis 300 nm zeigte sich lediglich das für nahezu alle Proteine typische Absorptionsmaximum bei 280 nm. Da keine Absorption im Wellenlängenbereich über 600 nm zu verzeichnen war, wird der Ausschnitt von 300–600 nm abgebildet (Abb. 2-4A). Verglichen wird ABA3-CT direkt nach der Ni-NTA-Aufreinigung sowie dasselbe Protein nach 24 h Luftoxidation bei 4 °C. Das aus beiden Spektren gebildete Differenzspektrum ist in Abbildung 2-4B gezeigt. Die insgesamt etwas schwächere Absorption des oxidierten ABA3-CT ist auf die Präzipitation eines Teils des Proteins zurückzuführen, das vor Aufnahme des Spektrums abzentrifugiert wurde.

Das UV/VIS-Spektrum von ABA3-CT zeigt mehrere charakteristische Absorptionsbereiche. Direkt nach der Aufreinigung sind Absorptionen um 315 nm und 465 nm zu erkennen. Zusätzlich zeigt sich eine Schulter im Bereich von 350–400 nm und eine leichte Absorption um 500–550 nm. Nach 24 h Luftoxidation ist ein Spektrum mit stärkerer Ausprägung der spektralen Eigenschaften zu erkennen. Die Absorptionen bei 315 nm und 465 nm sind profilierter und es tritt zusätzlich ein deutlich ausgeprägtes Maximum bei 395 nm auf, das auch von anderen Molybdoenzymen bekannt ist (MCP: Fischer *et al.*, 2006; pflanzliche und tierische SO: Eilers *et al.*, 2001; Garrett und Rajagopalan, 1996). Diese Absorption wird der

Bindung der Dithiolengruppe an das Molybdän zugeschrieben. Die Absorption im Wellenlängenbereich von 500-550 nm ist hingegen nicht mehr sichtbar und somit offenbar oxidationssensitiv. Das Differenzspektrum verdeutlicht die Veränderung der spektralen Eigenschaften nach Oxidation. Es weist die stärksten Maxima und somit die stärksten Veränderungen bei 365 nm, 430 nm und im Bereich von 500–540 nm auf.



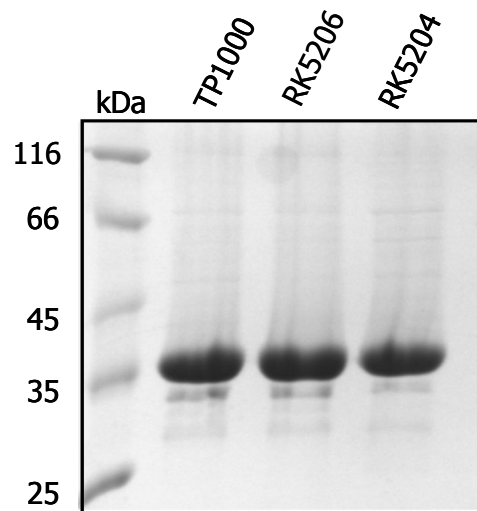
**Abb. 2-4: Spektrale Eigenschaften von ABA3-CT.** A: Direkt nach Ni-NTA-Aufreinigung (dunkelblaue Linie) zeigt ABA3-CT Absorptionen bei etwa 315 nm und 465 nm sowie Schultern im Bereich von 350 bis 400 nm und um 500 bis 550 nm. Nach 24 h Oxidation (hellblaue Linie) ist eine deutliche Ausprägung von Maxima bei 315, 395 und 465 nm zu erkennen. Die Absorption im Wellenlängenbereich um 500 nm ist nicht mehr erkennbar. B: Differenzspektrum der Spektren aus A, die Maxima liegen hier bei 365 nm, 430 nm und zwischen 500-540 nm.

#### 2.1.8.1 Spektrale Eigenschaften von in verschiedenen *E. coli* Expressionsstämmen exprimiertem ABA3-CT

ABA3-CT zeigt ein charakteristisches Spektrum mit verschiedenen Absorptionsbereichen. Es wurde zwar vermutet, dass diese spektralen Eigenschaften auf die Bindung des Moco zurückzuführen sind, jedoch weicht das Spektrum von ABA3-CT teilweise von den Absorptionsspektren anderer bekannter Molybdoenzyme ab. Auch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere chromophore Cofaktoren am Protein gebunden vorliegen und an der Ausbildung des Spektrums beteiligt sind. Aus der Charakterisierung der Cofaktorbindung (Tab. 2-1) ist außerdem bekannt, dass ABA3-CT sowohl Moco als auch MPT binden kann. Um eine klare Zuordnung der Absorptionsbereiche zur Art des gebundenen Cofaktors vornehmen zu können, wurde ABA3-CT in verschiedenen *E. coli* Expressionsstämmen exprimiert. Neben TP1000 wurde ABA3-CT im *mogA*-Stamm RK5206

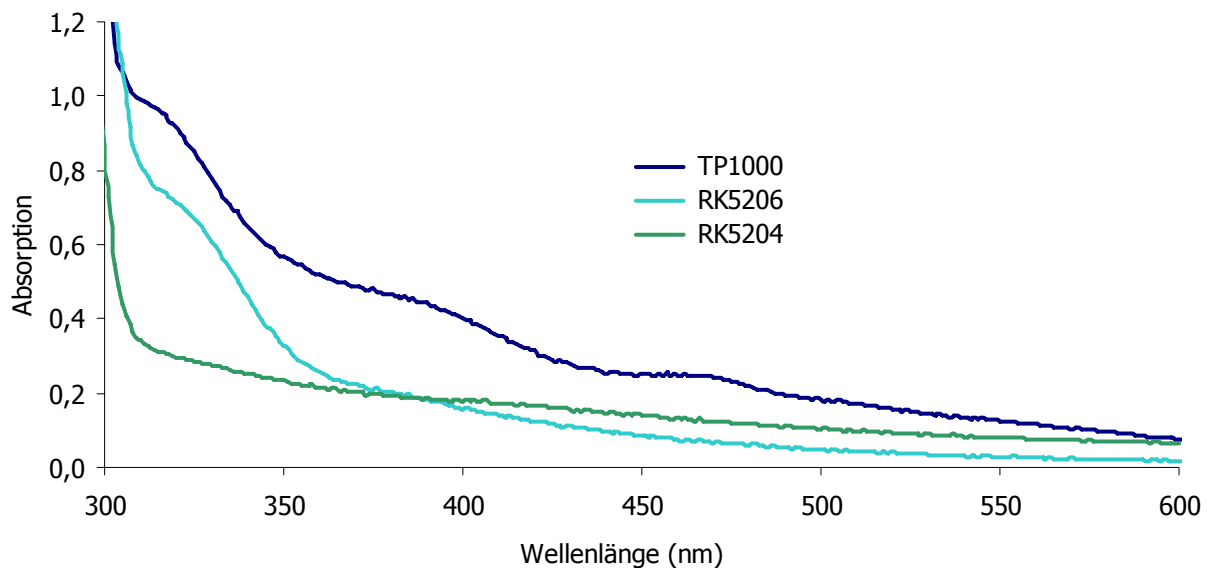


exprimiert, der keinen Moco synthetisieren kann und MPT akkumuliert. Weder Moco noch MPT kann der dritte genutzte Expressionsstamm, RK5204, bilden. Er wurde zur rekombinanten Expression des Cofaktor-freien ABA3-CT genutzt. Die Expressionsbedingungen waren für alle drei Stämme gleich. Es wurde bei der Expression in den Stämmen RK5204 und RK5206 lediglich auf die Zugabe des Molybdats verzichtet. Nach Ni-NTA-Aufreinigung konnten Proteine gleicher Reinheit und ähnlicher Konzentration erhalten werden (Abb. 2-5).



**Abb. 2-5: SDS-PA-Gelanalyse der affinitätschromatographisch aufgereinigten ABA3-CT aus verschiedenen Expressionsstämmen.** Gezeigt sind je 10 µg Ni-NTA aufgereinigter rekombinant exprimierter ABA3-CT aus den *E. coli*-Expressionsstämmen TP1000, RK5206 und RK5204 nach Auftrennung in einem 12%igen SDS-PA-Gel und Färbung mit Coomassie Brilliant Blue.

Von allen Proteinen wurden Spektren direkt nach Aufreinigung aufgenommen. Abbildung 2-6 zeigt die UV/VIS-Spektren im Vergleich. Das Spektrum des Cofaktor-freien ABA3-CT aus RK5204 weist im Bereich von 300-600 nm keine Absorption auf. Dies zeigt, dass alle spektralen Eigenschaften von ABA3-CT auf die Bindung von Moco/MPT zurückgeführt werden können. Der in RK5206 exprimierte ABA3-CT zeigt ausschließlich die Absorption bei 315 nm, die daher aus der Bindung des MPT resultiert und nicht Moco-spezifisch ist. Dieses Maximum wurde bisher für kein anderes Molybdoenzym beschrieben und scheint charakteristisch für die Bindung des MPT an ABA3-CT zu sein. Die anderen unter 2.1.8 beschriebenen spektralen Eigenschaften ergeben sich hingegen aus der Bindung des intakten Moco. Die Absorption bei 395 nm kann auf die Dithiolengruppe zurückgeführt werden, die anderen Absorptionen können jedoch nicht so eindeutig zugeordnet werden. Für Absorptionen im Bereich von 400-500 nm wird in Proteinen der SO-Familie die Bindung eines Cysteinliganden an das Molybdänzentrum verantwortlich gemacht (Garrett und Rajagopalan, 1996) bzw. die Bindung eines anderen Aminosäureliganden vorgeschlagen (Fischer *et al.*, 2006).



**Abb. 2-6: Spektrale Eigenschaften von ABA3-CT aus verschiedenen *E. coli*-Expressionsstämmen.** ABA3-CT wurde rekombinant in TP1000 (dunkelblaue Linie), RK5206 (hellblaue Linie) und RK5204 (grüne Linie) exprimiert und das Absorptionsspektrum direkt nach Ni-NTA-Aufreinigung aufgenommen. Die Proteine wurden zuvor auf 4 µg/µl verdünnt.

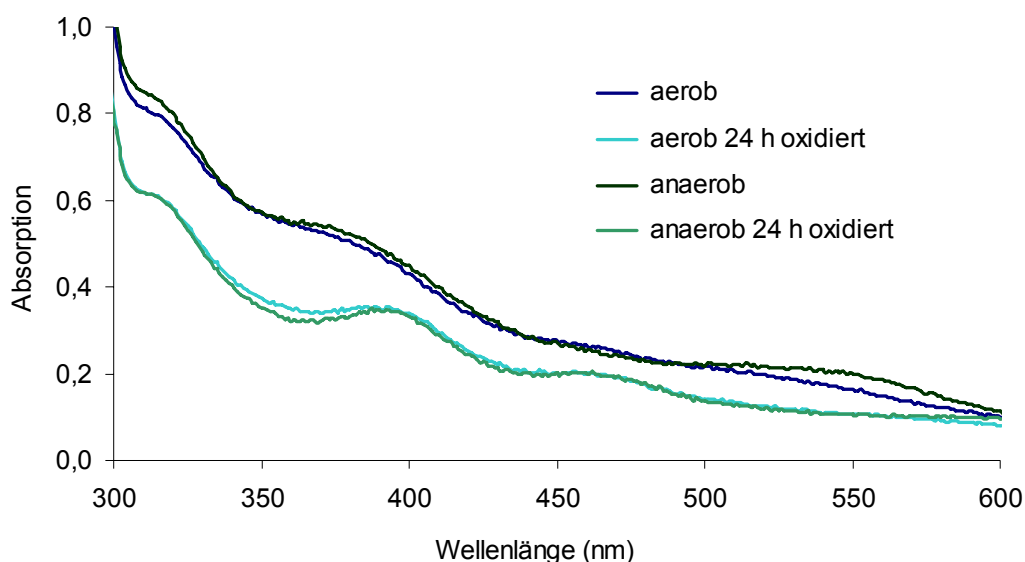
#### 2.1.8.2 Anaerobe Aufreinigung von ABA3-CT

Da sich nach Luftoxidation von ABA3-CT Unterschiede in den spektralen Eigenschaften des Proteins zeigten, wurde vermutet, dass der gebundene Moco nach der Aufreinigung zumindest teilweise reduziert vorliegt und oxidiert werden kann. Die Aufreinigung von ABA3-CT erfolgte allerdings durchgehend aerob. Da der Moco äußerst oxidationssensitiv ist, sollte durch eine anaerobe Aufreinigung überprüft werden, ob sich Unterschiede in den spektralen Eigenschaften des anaeroben Proteins zeigen. Es sollte auch gezeigt werden, ob sich eine bessere Cofaktorsättigung erzielen lässt. Zusätzlich konnte auch das eventuelle Binden anderer oxidationssensitiver prosthetischer Gruppen überprüft werden.

Die Aufarbeitung und Aufreinigung des unter üblichen Bedingungen exprimierten Proteins erfolgte unter einem Anaerobzelt, wozu vollständig entgaste Puffer verwendet wurden. Es wurde auf die Sonifizierung verzichtet, ansonsten entsprach die Durchführung der in Material und Methoden (4.4.1) beschriebenen Vorgehensweise. Aliquots von ABA3-CT wurden in einer Anaerobkuvette direkt nach Aufreinigung UV/VIS-spektroskopisch vermessen, danach 24 h luftoxidiert und erneut vermessen (Abb. 2-7). Das Spektrum des anaerob aufgereinigten Proteins unterscheidet sich signifikant im Bereich von 500–600 nm vom aeroben Protein, da es hier deutlich stärker absorbiert. Bereits zuvor wurde in diesem Wellenlängenbereich eine oxidationssensitive Absorption beobachtet. Das Maximum bei 465

nm erscheint hingegen erst nach 24 h Oxidation. Die bekannten Absorptionen bei 315 nm und 395 nm sind bei beiden Proteinen gleich ausgebildet. Nach 24 h Oxidation haben sich beide Spektren vollständig angeglichen.

Die Unterschiede in den spektralen Eigenschaften deuten auf eine Veränderung der Moco-Bindung am Protein nach Oxidation hin, deren Natur bisher unbekannt ist. Es gibt jedoch keine Hinweise auf die Bindung einer zusätzlichen prosthetischen Gruppe an ABA3-CT.



**Abb. 2-7: Spektrale Eigenschaften von ABA3-CT nach anaerober Aufreinigung.** ABA3-CT wurde anaerob aufgereinigt und das UV/VIS-Spektrum sofort (dunkelgrüne Linie) und nach 24 h Luftoxidation aufgenommen (hellgrüne Linie). Im Vergleich dazu ist das aerob aufgereinigte Protein gezeigt (blaue Linien).

Die FormA-Analyse des anaerob aufgereinigten Proteins zeigte eine erhöhte Cofaktorsättigung von 0,44 mol FormA/mol Protein, was einer um 25 % höheren Beladung im Vergleich zum aerob aufgereinigten Protein entspräche (durchschnittlich 0,35 mol FormA/mol Protein; siehe Tab. 2-1). Da es sich hierbei aber um einen Einzelversuch handelte, kann keine grundsätzliche Aussage über die Cofaktorsättigung bei anaerob aufgereinigten ABA3-CT gemacht werden.

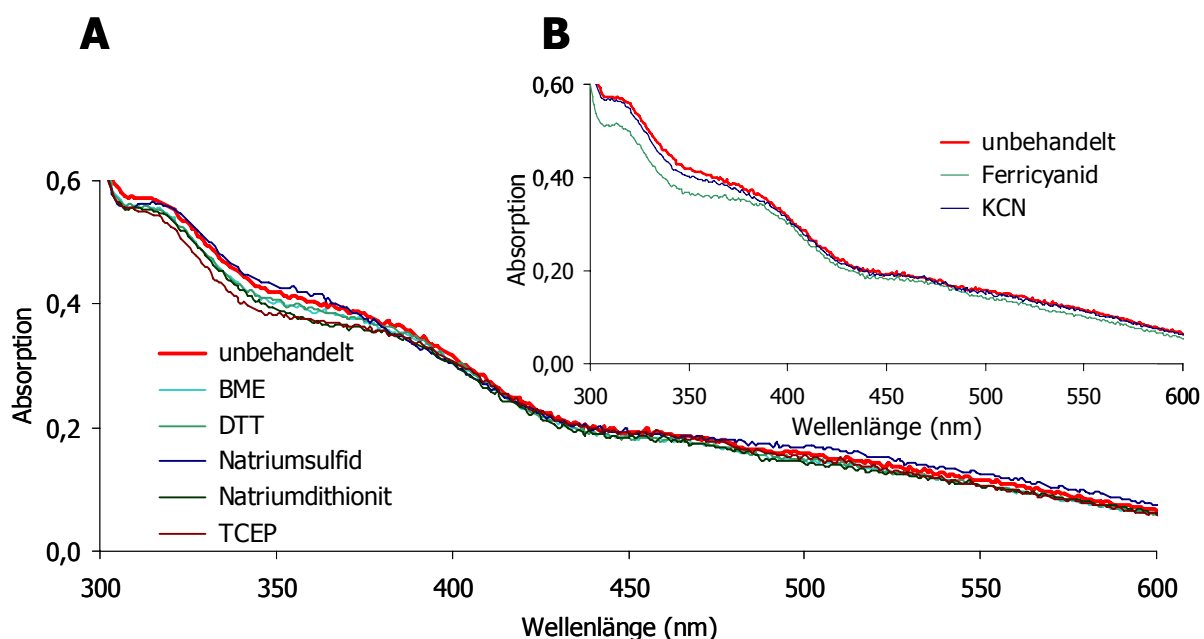
### 2.1.8.3 Einfluss von Oxidation und Reduktion auf die spektralen Eigenschaften von ABA3 CT

Die bisher gezeigten spektralen Eigenschaften von ABA3-CT deuten auf einen zumindest teilweise reduziert vorliegenden Cofaktor nach Ni-NTA-Aufreinigung des Proteins hin, so dass es nach Luftoxidation zur Ausprägung des oxidierten Spektrums kam. Um zu überprüfen, ob eine weitere, spektrometrisch nachzuvollziehende, Reduktion des Cofaktors möglich war,

sollte im Folgenden der Einfluss verschiedener Reduktionsmittel auf die Absorptionseigenschaften von ABA3-CT untersucht werden. Die zu testenden Reduktionsmittel wurden in Konzentration von 10 mM mit ABA3-CT coinkubiert und Spektren direkt nach Zugabe, nach 2 h und nach 24 h aufgenommen. Abbildung 2-8A und 2-9 zeigen die Spektren direkt nach Zugabe und nach 24 h. Ein weiterer Ansatz wurde mit dem Oxidationsmittel Ferricyanid versetzt, wodurch die Ausbildung des bekannten Oxidationsspektrums erwartet wurde (Abb. 2-8B und 2-9).

Die für ABA3-CT nachgewiesenen Absorptionen konnten zwar eindeutig der Bindung von Moco bzw. MPT zugeordnet werden (siehe 2.1.8), allerdings konnte ein möglicher Einfluss des terminalen Schwefels auf die spektralen Eigenschaften bisher nicht gezeigt werden. Zur Überprüfung eines solchen Einflusses wurde ABA3-CT mit Cyanid versetzt, wodurch eine vollständige Abspaltung des terminalen Schwefels erzielt werden sollte. Auch hier wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Spektren aufgenommen (Abb. 2-8B und 2-9).

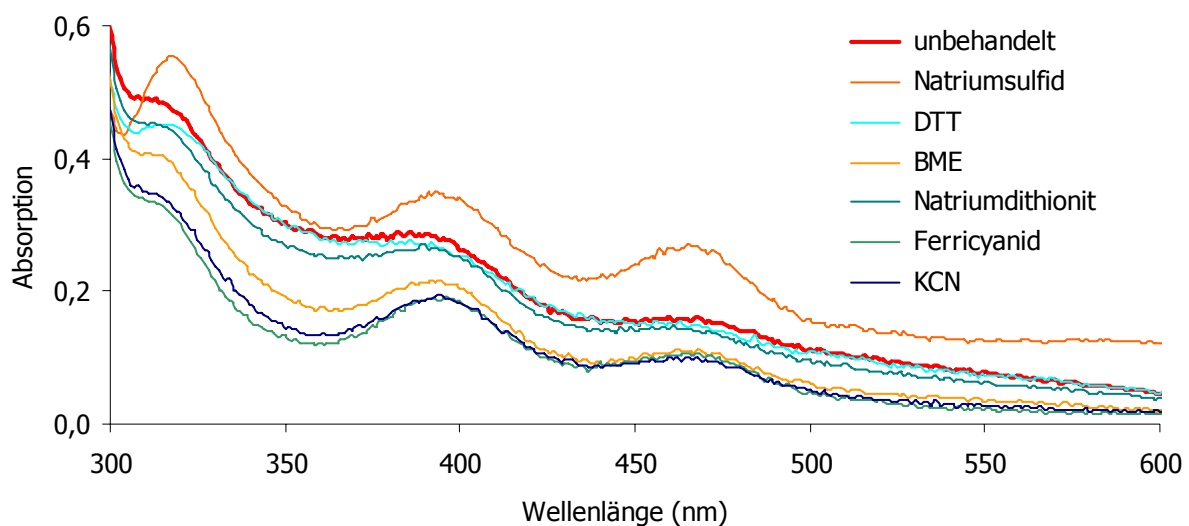
Direkt nach Zugabe der Reduktionsmittel wichen die erhaltenen Spektren kaum von dem des unbehandelten Proteins ab, lediglich nach Ferricyanidzugabe zeigte sich bereits eine stärkere Ausprägung der Maxima (2-8B).



**Abb. 2-8: UV/VIS-Spektren von ABA3-CT in Gegenwart von Reduktionsmitteln, Ferricyanid und Kaliumcyanid.** Die Spektren wurden sofort nach Zugabe der Reduktionsmittel (A) bzw. nach Zugabe von Ferricyanid und Kaliumcyanid (B) aufgenommen. Das unbehandelte Protein wurde luftoxidiert. BME =  $\beta$ -Mercaptoethanol, DTT = Dithiotreitol, TCEP = Tris(2-Carboxyethyl)Phosphin hydrochlorid.

Nach 24 h Inkubation hatten sich die charakteristischen Maxima bei 315 nm, 395 nm und 465 nm in allen Ansätzen unterschiedlich stark ausgebildet (Abb. 2-9). Die stärkste

Ausprägung bei gleichzeitiger Abnahme der Gesamtaborption wiesen die mit Ferricyanid und Kaliumcyanid sowie mit  $\beta$ -Mercaptoethanol behandelten Ansätze auf. Deutlich stärkere Absorption als das unbehandelte Protein zeigte das mit Natriumsulfid inkubierte Protein. Insgesamt konnten jedoch keine grundsätzlichen Unterschiede in den Absorptionseigenschaften zwischen mit Oxidationsmittel und mit Reduktionsmittel inkubiertem ABA3-CT festgestellt werden. Alle Spektren entsprachen in der Ausprägung dem durch Luftoxidation erhaltenen Spektrum. Da auch das mit Kaliumcyanid behandelte Protein gleiche spektrale Eigenschaften aufwies wie das unbehandelte Protein kann ein Einfluss des terminalen Schwefels auf die Absorptionseigenschaften von ABA3-CT ausgeschlossen werden.

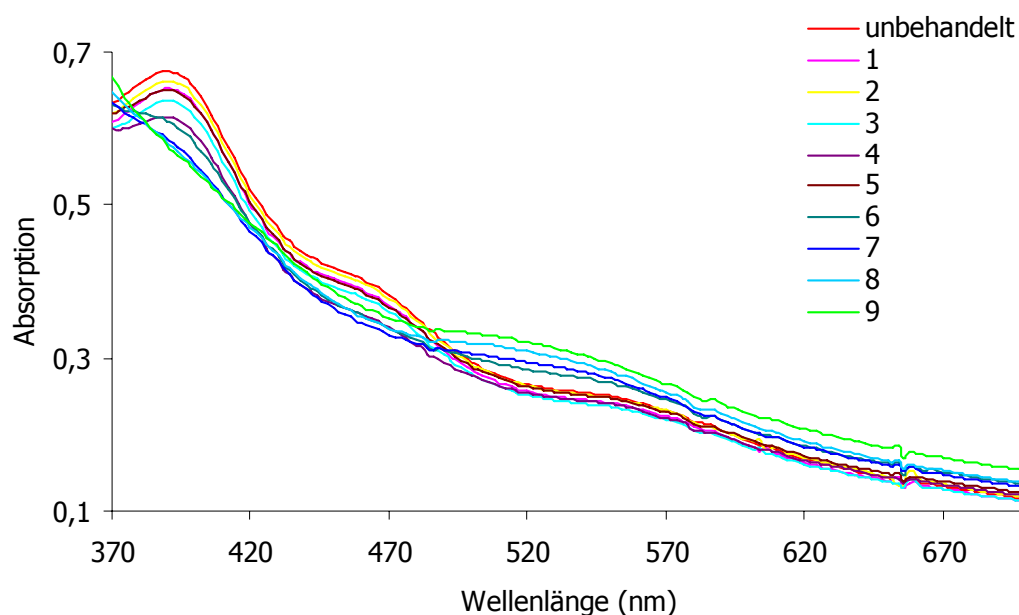


**Abb. 2-9: UV/VIS-Spektren von ABA3-CT in Gegenwart von Reduktionsmitteln, Ferricyanid und Kaliumcyanid nach 24 h.** Die Spektren wurden 24 h nach Zugabe der Reduktionsmittel bzw. nach Zugabe von Ferricyanid und Kaliumcyanid aufgenommen. Das unbehandelte Protein wurde luftoxidiert. BME =  $\beta$ -Mercaptoethanol, DTT = Dithiotreitol.

#### 2.1.8.4 Anaerobe Dithionit-Titration

Da die unter 2.1.8.3 beschriebene Inkubation mit Reduktionsmitteln aerob erfolgte, kam es möglicherweise zu keiner vollständigen Reduktion des Proteins, sondern zu einer durch das Reduktionsmittel verlangsamten Luftoxidation. Um sicher reduziertes Protein zu erhalten, erfolgte eine Titration von oxidiertem ABA3-CT durch Natriumdithionit unter anaeroben Bedingungen. Sowohl das Protein als auch die Dithionitlösung wurden zuvor anaerobisiert. Der Verlauf der Titration wurde am UV/VIS-Spektrophotometer im Bereich von 200–700 nm verfolgt. Da Dithionit im Bereich von 315 nm ein Absorptionsmaximum aufweist, konnten

Veränderungen in diesem Wellenlängenbereich nicht verfolgt werden, so dass der Ausschnitt von 370–700 nm abgebildet ist (Abb. 2-10). Bei beginnender Reduktion des ABA3-CT durch Dithionit konnte eine zunehmende Abflachung der Absorptionen bei 395 nm und 465 nm beobachtet werden, die mit einer gleichzeitigen Absorptionserhöhung im Bereich von 480–570 nm einhergeht. Weitere Reduktion führt schließlich zum vollständigen Absorptionsverlust des Proteins, der möglicherweise auf einen kompletten Verlust des Cofaktors zurückzuführen ist (ohne Abbildung). Eine anschließende Reoxidation des Proteins mit Wiederherstellung der ursprünglichen Absorptionseigenschaften war nach Umpuffern und Zugabe von Ferricyanid oder durch Luftoxidation nicht möglich.



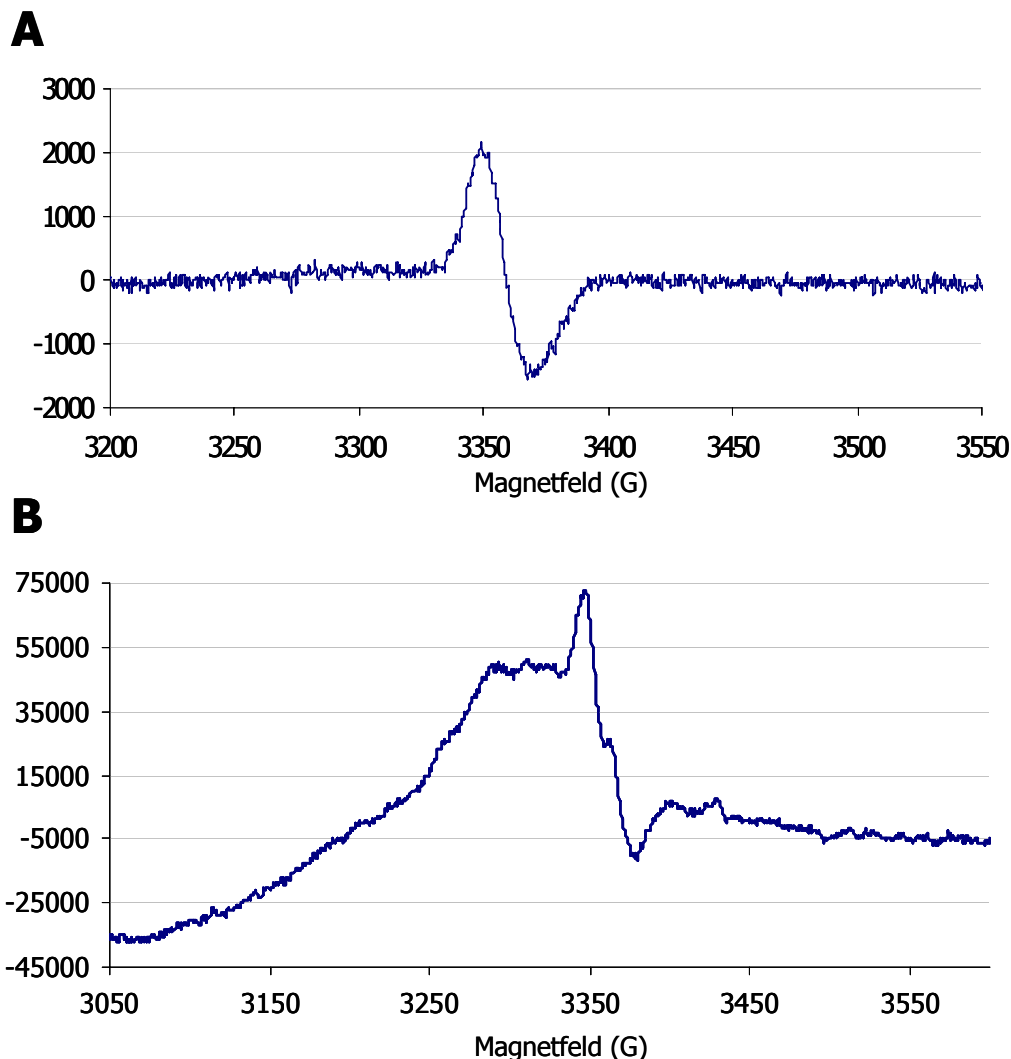
**Abb. 2-10: Anaerobe Natriumdithionit-Titration von ABA3-CT.** Mit 1-9 werden einzelne Schritte der Dithionit-Titration mit zunehmender Menge an Natriumdithionit bezeichnet. Da Dithionit bei 315 nm absorbiert, ist der Bereich vor 370 nm nicht gezeigt.

### 2.1.9 EPR-Spektroskopie von ABA3-CT

Für ABA3-CT konnte zwar der Nachweis des cyanolisierbaren terminalen Schwefels am Molybdän erbracht werden, jedoch war die weitere Liganden-Sphäre des Molybdänzentrums des Moco nicht bekannt. So konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob das Molybdänzentrum ähnlich wie bei den Zielproteinen der XO-Familie auch eine Hydroxy- und eine Oxogruppe als weitere Liganden aufweist oder ob das Molybdän bei ABA3-CT durch einen proteineigenen Aminosäurerest, z.B. ein Cystein, ligandiert wird wie es von den Enzymen der SO-Familie bekannt ist. Zur Klärung dieser Frage sollte die Elektronen-Paramagnetische Resonanz-(EPR-) Spektroskopie des Moco-beladenen ABA3-CT erfolgen.

Molybdän ist im Mo(V)-Zustand aufgrund des ungepaarten Elektrons im d-Orbital paramagnetisch und somit EPR-aktiv. Vom in diesem Zustand erhaltenen EPR-Spektrum können Rückschlüsse auf die unmittelbare Umgebung des Molybdäns gezogen werden. Dieser Mo(V)-Zustand stellt oft einen Übergangszustand in einer enzymatischen Reaktion dar und bildet sich z.B. bei der XDH während der Reduktion von Mo(VI) zu Mo(IV) aus (Hille, 1996). ABA3-CT wurde direkt nach Aufreinigung und nach 20 h Luftoxidation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und das EPR-Spektrum an einem Elektro Spin resonance ESP 300 (Bruker) durchgeführt, um zu überprüfen, ob bereits ein Teil des Molybdänzentrums Mo(V) aufweist. Es zeigte sich beim frisch aufgereinigten Protein ein für bisher charakterisierte Molybdoenzyme völlig untypisches EPR-Spektrum mit einem einzelnen isotropen Signal bei 3350 G, das üblicherweise nur durch das Flavin-Semiquinon-Radikal hervorgerufen wird (Hille, 1996) (Abb. 2-11A). Dieses Signal war in der luftoxidierten Probe nahezu verschwunden (ohne Abbildung). Da ABA3-CT jedoch kein FAD bindet und auch in seinem UV/VIS-Spektrum keinerlei Absorptionseigenschaften für einen solchen Cofaktor aufweist, konnte dieses Signal nicht interpretiert werden. Da der Moco an ABA3-CT offensichtlich redoxaktiv ist (siehe 2.1.8.3) und es sich bei dem Mo(V)-Zustand häufig um einen Übergangszustand handelt, wurde die unter 2.1.8.4 beschriebene anaerobe Dithionit-Titration durchgeführt und nach jeder Veränderung des UV/VIS-Spektrums ein Aliquot von ABA3-CT abgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die nachfolgende EPR-Spektroskopie eingesetzt. Auch hier konnte jedoch kein Mo(V)-Signal detektiert werden, das ursprüngliche isotrope Signal verschwand hingegen durch die Dithionit-Reduktion nahezu vollständig (ohne Abbildung). Gleiche Resultate wurden nach Oxidation durch Ferricyanid erhalten. Da der Mo(V)-Zustand oftmals nur sehr kurzlebig ist, wurden ebenfalls Ansätze vermessen, bei denen eine sehr schnelle Zugabe von Dithionit mit sofortigem Mischen und Schockgefrieren erfolgte. Zwar führte dies zu keinem neuen Signal, jedoch kam es bei einigen dieser Ansätze zu einer stärkeren Ausprägung des ursprünglich beobachteten Signals. Interessanterweise wies das EPR-Spektrum von Moco-freiem ABA3-CT, der im *E. coli*-Stamm RK5206 exprimiert wurde, kein EPR-Signal auf, was trotz des unüblichen EPR-Spektrums auf eine Molybdän-spezifische Ausbildung des Signals hindeutete. Einen weiteren Hinweis hierauf gab die Veränderung des ursprünglichen Spektrums durch die Zugabe von Arsenit, wodurch eine Aufspaltung des EPR-Signals beobachtet werden konnte (Abb. 2-11B). Eine solche Veränderung kann hervorgerufen werden, wenn das Arsenit in der Nähe des Molybdänzentrums bindet und dadurch dessen Umgebung so ändert, dass das EPR-Spektrum beeinflusst wird. Auch wenn es also Hinweise auf ein EPR-Signal durch das Molybdänzentrum gab, ließ sich aus den erhaltenen EPR-Spektren keine Information über die Art des Molybdänliganden am Moco von ABA3-CT gewinnen. Möglicherweise gibt es trotz des

redoxaktiven Moco von ABA3-CT keinen detektierbaren Mo(V)-Zustand, der ein interpretierbares EPR-Signal hervorruft.



**Abb. 2-11: EPR-Spektren von ABA3-CT.** Gezeigt sind die EPR-Spektren von frisch aufgereinigtem ABA3-CT (A) und nach Dithionit-Reduktion und anschließender Zugabe von Arsenit (B). Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei einer Temperatur von -123 °C (150 K) vermessen. Die Spektren wurden mit einer Mikrowellenfrequenz von 9,46 GHz und einer Mikrowellenenergie von 2mW bei einer Modulationsfrequenz von 100 kHz aufgenommen. Die Modulationsamplitude betrug 2,01 G (A) bzw. 5,05 G (B).

### 2.1.10 Bestimmung exponierter Cysteinreste an ABA3-CT

ABA3-CT weist in seiner Aminosäuresequenz neun Cysteine auf von denen drei Cysteine unter allen bisher beschriebenen Moco-Sulfurase C-Termini strikt konserviert sind. Kürzlich konnte in *in vitro*-Experimenten gezeigt werden, dass ein Persulfidtransfer von ABA3-NifS zu ABA3-CT möglich ist (Dissertation Torsten Heidenreich, 2007). Damit ein solcher Transfer

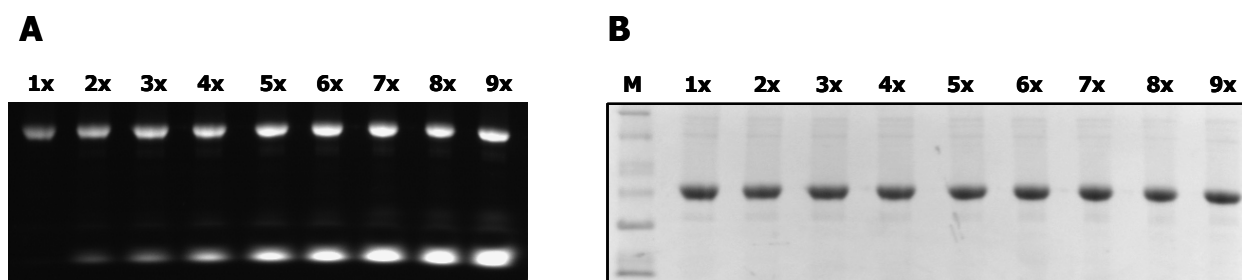


erfolgen kann, muss das zu übertragende Persulfid an einen exponierten Cysteinrest am ABA3-CT binden können, d.h. die Sulfhydrylgruppe des Cysteins muss frei zugänglich sein. In dieser Arbeit sollte gezeigt werden über wie viele exponierte Cysteinreste ABA3-CT verfügt, die in der Lage wären, ein Persulfid aufzunehmen. Verschiedenste Reagenzien können an Thiolgruppen, und somit auch an Cysteine binden, dazu gehören das fluoreszierende N-Iodoacetyl-N` (5-Sulfo-1-Naphthyl)Ethyldiamin (1,5-I-AEDANS) und die 5,5`-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB). Beide Reagenzien wurden zum Nachweis exponierter Cysteine an ABA3-CT eingesetzt.

#### **2.1.10.1 Detektion freier Sulfhydrylgruppen mit 1,5-I-AEDANS**

1,5-I-AEDANS wirkt nicht denaturierend und kann nach der Bindung an Proteine oder niedermolekulare Substanzen mit Thiolgruppen unter UV-Licht im SDS-PA-Gel nachgewiesen werden.

Zum Nachweis der exponierten Cysteine wurde Cofaktor-freier ABA3-CT aus RK5204 verwendet, um homogenes Protein zu nutzen. In neun Ansätzen wurden je 15 µg ABA3-CT mit 1,5-I-AEDANS coinkubiert, wobei 1,5-I-AEDANS von der zu ABA3-CT äquimolaren Menge bis zum neunfachen Überschuss eingesetzt wurde. Somit wurde gewährleistet, dass im Extremfall alle neun Cysteinreste vollständig durch 1,5-I-AEDANS abgesättigt werden könnten. Nach 1 h Coinkubation bei 4 °C wurde freies 1,5-I-AEDANS durch die Zugabe von L-Cystein abgebunden. Nach Auftrennung im nachfolgenden 12 %-igen SDS-PA-Gel konnten unter UV-Licht zwei Banden voneinander unterschieden werden (Abb. 2-12A). Die obere Bande zeigt an die freien Cysteinreste von ABA3-CT gebundenes 1,5-I-AEDANS, in der unteren Bande läuft das durch L-Cystein gebundene, zuvor überschüssige 1,5-I-AEDANS. Es ist zu erkennen, dass bei äquimolarem Einsatz das gesamte 1,5-I-AEDANS durch ABA3-CT gebunden wurde. Bei zweifachem Überschuss liegt nur wenig ungebundenes 1,5-I-AEDANS in der L-Cystein-Bande vor. Die Fluoreszenz der Proteinbanden ist in diesen Ansätzen noch schwächer ausgeprägt als in den nachfolgenden Ansätzen. Dies wies eindeutig die Existenz mindestens eines exponierten Cysteinrestes nach und machte das Vorhandensein eines zweiten exponierten Cysteinrestes wahrscheinlich. Die nachfolgende Coomassie-Färbung des SDS-PA-Gels (Abb. 2-12B) zeigt, dass gleiche Proteinmengen in allen Ansätzen vorlagen.



**Abb. 2-12: Nachweis exponierter Cysteine an ABA3-CT.** Je 15  $\mu\text{g}$  ABA3-CT wurden mit steigenden Mengen 1,5-I-AEDANS coinubiert: von der äquimolaren Menge (1x) bis zum neunfach molarem Überschuss (9x). A: 1,5-I-AEDANS-abhängige Fluoreszenz am ABA3-CT (oben) und durch überschüssiges nicht-proteingebundenes 1,5-I-AEDANS (unten) unter UV-Licht B: 12%iges SDS-PA-Gel nach Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue.

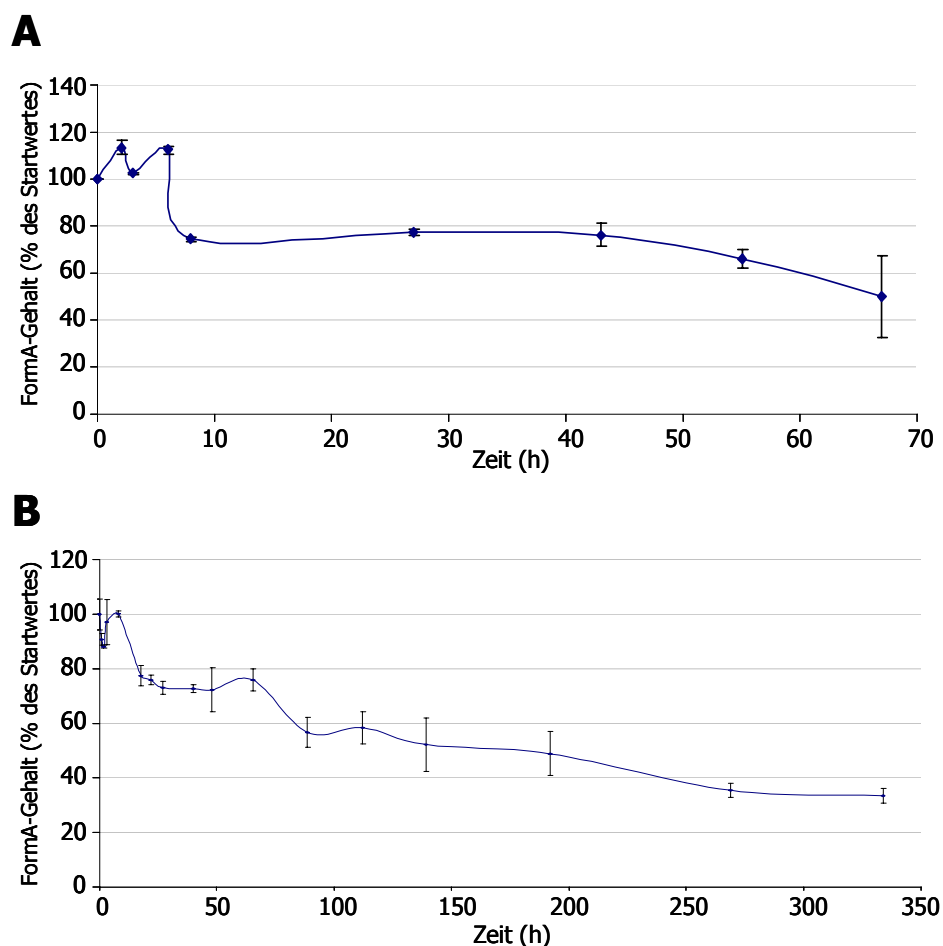
### 2.1.10.2 Detektion freier Sulfhydrylgruppen mit DTNB

Zur Identifizierung freier Cysteinreste in ABA3-CT wurden auch Markierungsversuche mit DTNB (Ellman's Reagenz) durchgeführt. DTNB ist ebenso wie 1,5-I-AEDANS nicht in der Lage, Proteine zu denaturieren oder Disulfidbrücken zu spalten. Es reagiert mit zugänglichen Thiolen zu einem gemischten Disulfid, wobei eine zu den Thiolen äquivalente Menge an 5-Thio-2-Nitrobenzoat freigesetzt wird. Dieses lässt sich photometrisch über die Absorption bei 412 nm quantifizieren. Zur exakten Quantifizierung wurde eine L-Cystein-Kalibriergerade in Dreifachbestimmung für einen Konzentrationsbereich von 0–50  $\mu\text{M}$  erstellt (Anhang). Ebenso wie unter 2.1.10.1 wurde rekombinant exprimierter Cofaktor-freier ABA3-CT aus RK5204 verwendet. Die Umrechnung der erhaltenen  $\text{OD}_{412}$  mittels der L-Cystein-Kalibriergerade ergab  $2,03 \pm 0,08$  berechnete Sulfhydrylgruppen an ABA3-CT. Dies bestätigte die aus 2.1.10.1 gewonnene Vermutung von wahrscheinlich zwei exponierten Cysteinen. Die meisten Cysteine an ABA3-CT wären somit unzugänglich im Inneren des Proteins verborgen oder möglicherweise an Disulfidbrücken beteiligt.

### 2.1.11 Cofaktorstabilität an ABA3-CT

Der unter 2.1.7 beschriebene  $K_D$ -Wert für die Bindung des Cofaktors an ABA3-CT deutete bereits auf eine hohe Affinität des Moco zu ABA3-CT hin. Aufgrund seiner starken Oxidationssensitivität degradiert nicht-proteingebundener Moco, der frei in Lösung vorliegt, innerhalb weniger Minuten zu FormB. Über die Bestimmung einer Halbwertszeit der Moco-Bindung an ABA3-CT sollte die Fähigkeit von ABA3-CT untersucht werden, den Cofaktor zu stabilisieren und somit vor Oxidation zu schützen. Moco-haltiger ABA3-CT wurde sowohl bei

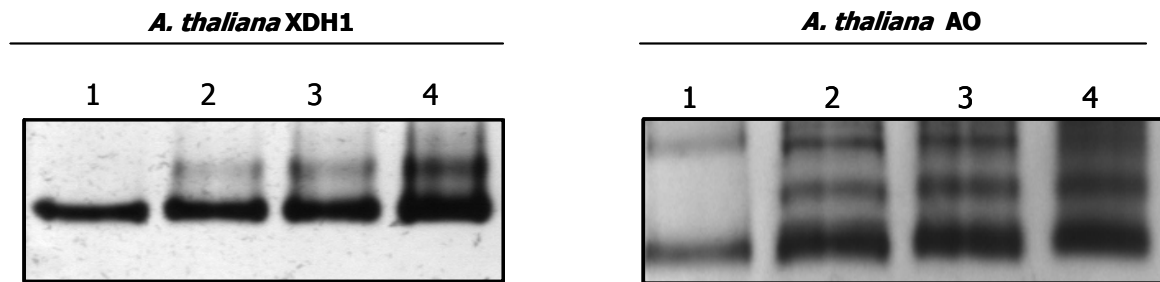
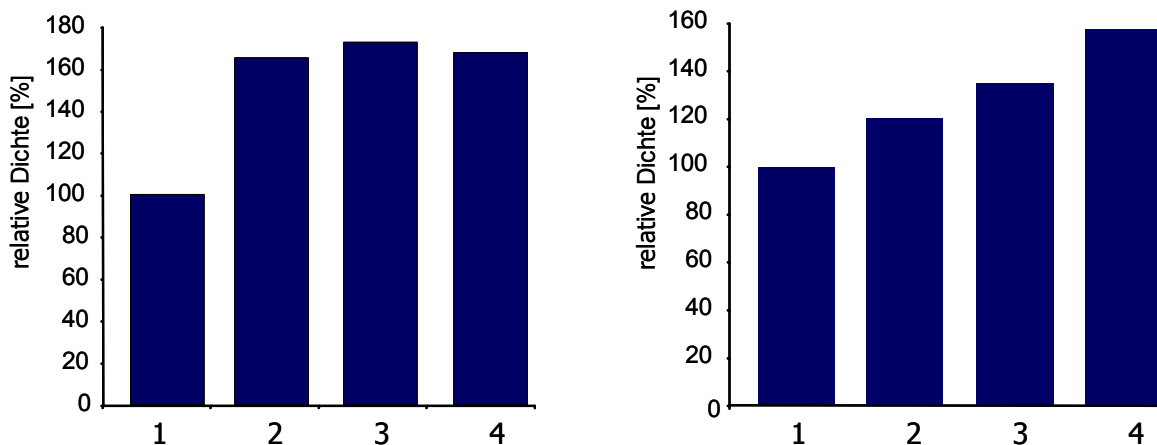
4 °C als auch bei 22 °C inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf seinen FormA-Gehalt getestet. Es zeigte sich, dass ABA3-CT den gebundenen Cofaktor über einen langen Zeitraum stabilisieren kann und es nur zu einem langsamen Verlust des Cofaktors kommt. Erfolgt die Inkubation bei 4 °C, liegt nach 190 h noch etwa die Hälfte der Ausgangs-Cofaktormenge vor und auch nach 334 h konnten immer noch 33 % der Startmenge nachgewiesen werden (Abb. 2-13B). Somit liegt die Halbwertszeit für den an ABA3-CT gebundenen Cofaktor bei 4 °C bei etwa acht Tagen. Wird ABA3-CT bei Raumtemperatur inkubiert, kommt es erfahrungsgemäß zu einer stärkeren Präzipitation des Proteins, so dass ein stärkerer Verlust des Cofaktors zu erwarten war. Tatsächlich reduzierte sich hier die Cofaktormenge nach 67 h auf 50 % des Startwertes (Abb. 2-13A), was damit der Halbwertszeit des Cofaktors bei 22 °C entspricht. Bei beiden Versuchsansätzen sind die stärksten Cofaktorverluste zu Beginn nach etwa 8 - 10 h zu verzeichnen, was wahrscheinlich auf die zunächst starke Präzipitation des Proteins zurückzuführen ist.



**Abb. 2-13: Moco-Stabilität an ABA3-CT.** Gezeigt ist die Abnahme des Cofaktorgehaltes über die Zeit. A: Inkubation von ABA3-CT bei 22 °C über einen Zeitraum von 67 h. Nach dieser Zeit war das restliche Protein präzipitiert, so dass keine weiteren Zeitwerte aufgenommen wurden. B: Inkubation von ABA3-CT bei 4 °C über einen Zeitraum von 334 h. Mit 100 % wird die FormA-Menge zu Beginn der Inkubation angegeben (n = 2).

### **2.1.12 Interaktion von ABA3-CT mit Aldehydoxidase und Xanthindehydrogenase**

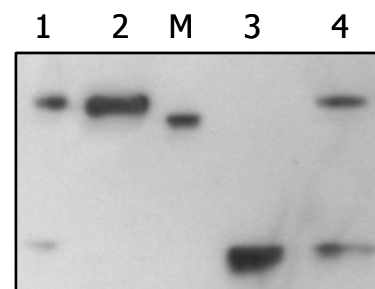
ABA3-NifS ist *in vitro* alleine in der Lage, die Funktionen der Moco-Sulfurase zu übernehmen und AO und XDH zu aktivieren. Dies zeigt sich u.a. durch die Überaktivierung rekombinant exprimierter AO und XDH, die im nativen PA-Gel durch Aktivitätsfärbung nachgewiesen werden konnte (Heidenreich *et al.*, 2005). Eine solche Aktivierung konnte bisher durch ABA3-CT nicht gezeigt werden, allerdings wurde in der Vergangenheit ausschließlich nahezu Moco-freier ABA3-CT eingesetzt (siehe 2.1.1). In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, ob grundsätzlich auch eine Interaktion zwischen ABA3-CT und den Zielproteinen und eine zusätzliche Aktivierung von AO und XDH durch den Moco-beladenen ABA3-CT möglich ist. Steigende Mengen von ABA3-CT wurden hierzu zunächst für 30 min bei 22 °C mit rekombinant exprimierter *A. thaliana* XDH1 bzw. AO $\alpha$  coinkubiert und die Proteine anschließend im nativen 7,5 % PA-Gel aufgetrennt. Als Kontrollen wurden Ansätze mitgeführt, die ausschließlich ABA3-CT bzw. AO oder XDH enthielten. Die Aktivitätsfärbung erfolgte unter Einsatz der Substrate Indol-3-carboxaldehyd im Fall von AO und Hypoxanthin im Fall von XDH (Abb. 2-14A). Wie zu sehen ist, führte die Coinkubation der Zielproteine mit ABA3-CT zu einer Aktivitätssteigerung von AO und XDH. Es zeigte sich sowohl eine stärkere Ausprägung der ursprünglichen unteren Aktivitäts-Bande, die schwächer bereits in den Kontrollansätzen von AO und XDH auftritt, als auch die Ausbildung einer zweiten etwas höher laufenden Bande, die unterschiedlich stark ausgeprägt ist und auf eine Interaktion von ABA3-CT mit den Zielproteinen zurückgehen könnte. ABA3-CT alleine zeigte, wie erwartet, keinerlei Aktivität (ohne Abbildung). Die densitometrische Vermessung beider Banden ermöglichte die Quantifizierung dieser Aktivitätssteigerung, die nach Coinkubation mit ABA3-CT 167 % und 158 % im Vergleich zur XDH- bzw. AO-Kontrolle beträgt (Abb. 2-14B). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sulfurierter Moco-beladener ABA3-CT grundsätzlich in der Lage ist, AO und XDH zu aktivieren. Um zu zeigen, ob die zweite, nach Coinkubation neu auftretende Bande tatsächlich auf die Interaktion zwischen ABA3-CT und dem Zielprotein zurückgeht, wurde im AO-Aktivitätsgel sowohl diese Bande als auch die untere Bande aus dem nativen Gel ausgeschnitten und über ein SDS-PA-Gel erneut aufgetrennt. Im nachfolgenden Western-Blot mit einem gegen den His-Tag gerichteten Antikörper konnten in beiden Aktivitätsbanden zwei Proteine mit einer Größe von 35 kDa und 150 kDa detektiert werden, die auf gleicher Höhe liefen wie die ebenfalls mitgeführten ABA3-CT- und AO $\alpha$ -Kontrollen (Abb. 2-15). Beide auftretende Banden des nativen PA-Gels enthalten also sowohl AO als auch ABA3-CT, was eine Interaktion beider Proteine möglich erscheinen lässt.

**A****B**

**Abb. 2-14: Aktivitätssteigerung von *A. thaliana* AOα und XDH1 durch ABA3-CT.** A: Gezeigt sind die Aktivitätsfärbungen im nativen 7,5 % PA-Gel unter Nutzung des Substrates Indol-3-carboxaldehyd nach Coinkubation von AOα mit ABA3-CT und des Substrates Hypoxanthin nach Coinkubation von XDH1 mit ABA3-CT. Ansatz 1 enthält ausschließlich 2 µg AOα bzw. XDH1, die nachfolgenden Ansätze zusätzlich steigende Mengen an ABA3-CT (10, 20 und 50 µg). B: Ergebnis der densitometrischen Vermessung beider Banden aus A unter Nutzung des Programms ImageJ 1.38x (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Die Angaben sind prozentuale Verhältnisse im Vergleich zu Spur 1 (= 100 %).

**Abb. 2-15: Western-Analyse der AO-Aktivitätsbanden.**

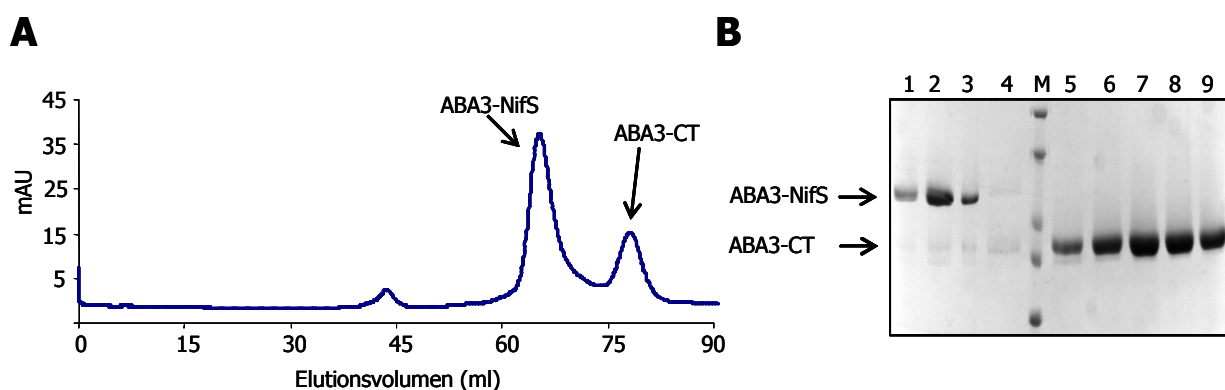
Die Aktivitätsbanden aus dem nativen PA-Gel (Abb. 2-14A) wurden auf einem 7,5 % SDS-PA-Gel erneut aufgetrennt und über einen gegen den His-Tag gerichteten Antikörper detektiert. 1: Auftrennung der zusätzlich auftretenden oberen Aktivitätsbande; 2: AO-Kontrolle; 3: ABA3-CT-Kontrolle; 4: Auftrennung der unteren Aktivitätsbande. M = Marker, die obere Bande des Markers von 116 kDa wurde unspezifisch erkannt.



### 2.1.13 *in vitro* Transfer des Moco von ABA3-NifS zu ABA3-CT

Nachdem für ABA3-CT die Bindung des Moco gezeigt und charakterisiert werden konnte, wurde auch ABA3-NifS über den FormA-Nachweis auf eine mögliche Moco-Bindung hin

untersucht. Erstaunlicherweise zeigte sich auch hier, dass ABA3-NifS grundsätzlich die Fähigkeit besitzt, den Moco zu binden. Der für ABA3-NifS bestimmte FormA-Gehalt lag jedoch mit durchschnittlich 0,05 mol FormA/mol ABA3-NifS deutlich unter dem für ABA3-CT bestimmten Cofaktor-Gehalt. (Dissertation Torsten Heidenreich, 2007). Auch wenn nicht klar ist, ob eine Moco-Bindung an ABA3-NifS auch *in vivo* erfolgt, sollte die Möglichkeit eines Cofaktor-Transfers von ABA3-NifS zu ABA3-CT *in vitro* geprüft werden. ABA3-NifS mit einem Cofaktor-Gehalt von 6,44 pmol FormA/nmol Protein und Cofaktor-freier ABA3-CT aus dem *E. coli*-Expressionsstamm RK5204 wurden für 30 min bei 22 °C coinkubiert und anschließend über Größenausschluss-Chromatographie (Superdex 200pg) wieder voneinander separiert (Abb. 2-16A). Es konnten Fraktionen mit reinem ABA3-CT isoliert werden (Abb. 2-16B), die mittels FormA-Analyse auf ihren Cofaktor-Gehalt getestet wurde. Es wurden an ABA3-CT 1,3 pmol FormA/nmol Protein bestimmt. Hierdurch konnte ein *in vitro* Transfer des Cofaktors von ABA3-NifS zu ABA3-CT nachgewiesen werden.



**Abb. 2-16:** *in vitro* Transfer des Moco von ABA3-NifS zu ABA3-CT. Moco-beladenes ABA3-NifS wurde mit Cofaktor-freiem ABA3-CT für 30 min bei 22 °C coinkubiert und anschließend über Größenausschluss-Chromatographie (A) getrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ein 12 %iges SDS-PA-Gel aufgetragen (B) und die Reinheit von ABA3-CT überprüft bevor ein FormA-Nachweis für ABA3-CT erfolgt. Die Spuren 1-4 enthalten Fraktionen aus dem Elutionsbereich von 60-70 ml; Spuren 5-9 sind Fraktionen aus dem Elutionsbereich von 75-85 ml. (M = molekularer Marker mit den Größen 116, 66, 45, 35 und 25 kDa).

#### 2.1.14 Charakterisierung der *sir3-3*-Mutante aus *A. thaliana*

2005 gelang Dai *et al.* die Identifizierung zweier neuer *aba3*-Mutanten nach Durchführung eines Sirtinol-Screenings. Sie suchten nach *A. thaliana*-Pflanzen, die eine Insensitivität gegenüber dem synthetischen Auxin-Derivat Sirtinol zeigten. Durch die Gabe des Sirtinols wird bei Wildtyp-Pflanzen eine Auxin-abhängige Antwort induziert. Da ein wichtiger Schritt, nämlich die Umwandlung von HNA (2-hydroxy-1-naphthaldehyde) zu HNC (2-hydroxy-1-

[illegible]

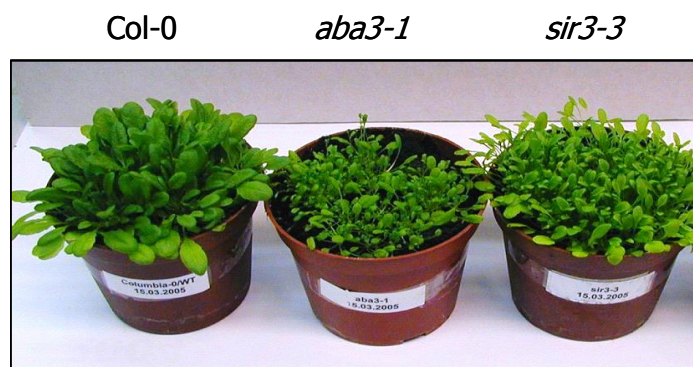
- 39 -



Durch die *sir3-3*-Mutation wurde die *in vivo*-Bedeutung der C-terminalen Domäne für die Moco-Sulfurierung untermauert. Um den Einfluss der Mutation näher zu untersuchen, sollten sowohl die *sir3-3*-Pflanzen näher charakterisiert werden als auch eine rekombinante ABA3-CT-Variante erstellt werden, die die *sir3-3*-Mutation repräsentiert.

#### 2.1.14.1 Analyse der AO- und XDH-Aktivität von *sir3-3* Pflanzen

Die Samen für die *sir3-3*-Mutante wurden freundlicherweise durch Prof. Yunde Zhao (University of California at San Diego) zur Verfügung gestellt. Die *sir3-3*-Pflanzen zeigten im Vergleich zu *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen ein verlangsamtes Wachstum und insgesamt kleineren Wuchs. Der Phänotyp war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei der *aba3-1*-Mutante, die eine Punktmutation in ABA3-NifS aufweist (Abb. 2-18).

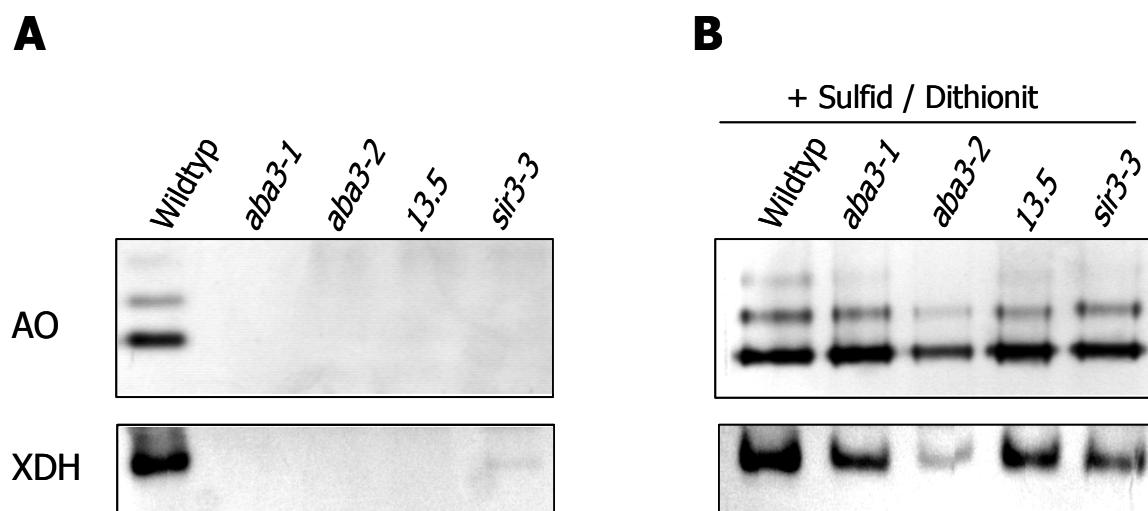


**Abb. 2-18: Phänotyp der *A. thaliana sir3-3*-Mutante.** Gezeigt ist die *A. thaliana sir3-3* Mutante im Vergleich mit einer gleich alten Columbia-0-Wildtyp-Pflanze und einer *aba3-1*-Mutante. Die Pflanzen sind vier Wochen alt.

Um die *sir3-3*-Mutante auf ihre AO- und XDH-Aktivitäten zu untersuchen, wurden von der *sir3-3*-Pflanze zunächst durch Mörsern in Extraktionspuffer (siehe 4.3.2) Rohextrakte hergestellt. AO und XDH wurden durch Ammoniumsulfat-Präzipitation gefällt und nach Entsalzen auf ein natives PA-Gel aufgetragen. Der Nachweis der Aktivitäten von AO und XDH erfolgte durch die unter 4.4.15 beschriebene Aktivitätsfärbung im Gel. Als Kontrolle dienten Rohextrakte einer Wildtyp-Columbia-0-Pflanze, sowie Rohextrakte der *aba3*-Mutanten *aba3-1*, *aba3-2* und *13-5* (Abb. 2-19A). Die beiden letzteren Mutanten weisen trunkierte Versionen von ABA3 auf und zeichnen sich ebenso wie *aba3-1* durch einen totalen Verlust der AO- und XDH-Aktivitäten aus. Wie zu sehen ist, zeigt die *sir3-3*-Mutante eine starke Reduktion sowohl der AO- als auch der XDH-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp.



Allerdings ist weiterhin eine Restaktivität beider Monooxo-Hydroxylasen zu erkennen. Die Apoproteine konnten in der *sir3-3*-Mutante durch AO- und XDH-Antikörper in gleichen Mengen wie im Wildtyp nachgewiesen werden (ohne Abbildung), so dass ausgeschlossen werden konnte, dass die geringere Aktivität auf eine geringere Menge des Gesamtproteins zurückzuführen ist. Die Monooxo-Hydroxylasen aller bisher bekannten *aba3*-Mutanten konnten durch chemische Sulfurierung durch Natriumsulfid und Natriumdithionit aktiviert werden. Eine solche Sulfurierung erfolgte anaerob mit den oben aufgeführten Rohextrakten. Anschließend wurden die Aktivitäten erneut im nativen PA-Gel nachgewiesen (Abb. 2-19B). Es zeigte sich, dass sich die Rohextrakte der *sir3-3*-Mutante ebenso wie die der bekannten *aba3*-Mutanten durch chemische Sulfurierung aktivieren ließen. AO- und XDH-Aktivitäten erreichten Wildtyp-Level. Hierdurch konnte eindeutig gezeigt werden, dass ABA3-CT an der Moco-Sulfurierung von AO und XDH beteiligt ist und eine Mutation in der C-terminalen Domäne einen ähnlichen Phänotyp hervorrufen kann, wie eine Mutation in ABA3-NifS.

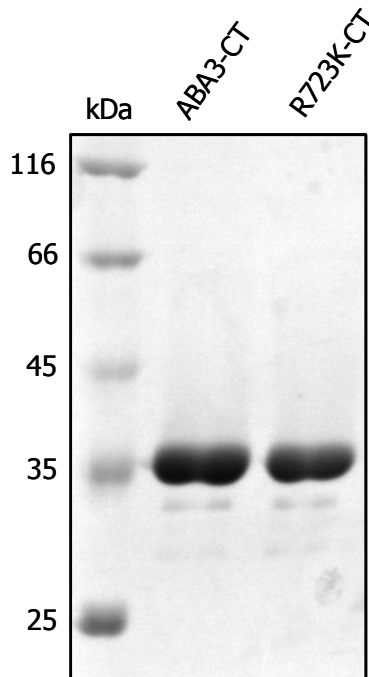


**Abb. 2-19: AO- und XDH-Aktivitäten der *sir3-3*-Mutante.** Gezeigt sind AO- und XDH-Aktivitätsfärbungen im nativen PA-Gel von *sir3-3*-Rohextrakten, sowie von einem Wildtyp-Pflanzenrohextrakt und Rohextrakten der *aba3*-Mutanten *aba3-1*, *aba3-2* und *13-5*. A: AO- und XDH-Aktivitäten unbehandelter Pflanzenrohextrakte. B: AO- und XDH-Aktivitäten nach anaerober chemischer Sulfurierung mittels Natriumsulfid und Natriumdithionit.

#### 2.1.14.2 Klonierung und Expression von ABA3-CT/R723K

Um die Natur der *sir3-3*-Mutante besser verstehen zu können, sollte eine ABA3-CT-Variante kloniert werden, die die *sir3-3*-Mutation widerspiegelt. Hierzu wurde über Fusions-PCR (siehe 4.2.4.2) an Nukleotid-Position 2168 ein Guanin zu Adenosin-Austausch vorgenommen, der auf Aminosäuresequenzebene zu einem Austausch des Arginins 723 zu einem Lysin führt.

Die erhaltene mutierte cDNA wurde nach Sequenzierung ungerichtet über *Bam*HI-Restriktions-Schnittstellen in den Expressionsvektor pQE80 kloniert. ABA3-CT/R723K (R723K-CT) wurde unter den für ABA3-CT optimalen Expressionsbedingungen exprimiert und konnte in ähnlicher Reinheit und ähnlichen Mengen wie das Wildtyp-Protein erhalten werden (Abb. 2-20), so dass ein Einfluss der eingefügten Mutation auf die strukturelle Integrität des Proteins unwahrscheinlich war.

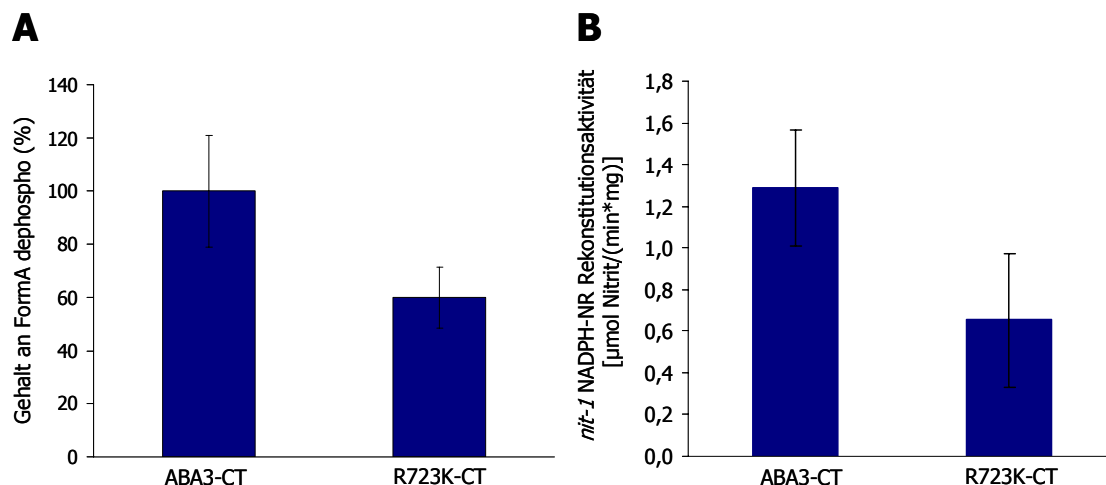


**Abb. 2-20: SDS-PA-Gelanalyse der affinitätschromatographisch aufgereinigten Variante ABA3-CT/R723K im Vergleich mit ABA3-CT.** Gezeigt sind je 10 µg Ni-NTA aufgereinigter rekombinant exprimierter ABA3-CT und die Variante R723K-CT nach Auftrennung in einem 12 %igen SDS-PA-Gel und Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue.

#### 2.1.14.3 Charakterisierung der Cofaktorbindung an R723K-CT

Um einen möglichen Einfluss der *sir3-3*-Mutation auf die Bindung des Moco zu untersuchen, sollte anhand des rekombinant exprimierten Proteins eine Analyse der Cofaktorbindung erfolgen und mit der des Wildtyp-Proteins verglichen werden. Bei jedem Expressionsansatz für R723K-CT wurde ABA3-CT parallel exprimiert, um stets einen direkten Vergleich zwischen beiden exprimierten Proteinen ziehen zu können. Zunächst erfolgte zur Ermittlung des Gesamtcofaktorgehaltes eine FormA-Analyse, die für R723K-CT eine signifikante Reduzierung des Cofaktorgehaltes um 40 % im Vergleich zu ABA3-CT ergab (Abb. 2-21A). Dieser reduzierte Cofaktorgehalt spiegelte sich auch im *nit-1*-Assay wider, in dem die Variante deutlich geringere Umsatzraten als das Wildtyp-Protein zeigte (Abb. 2-21B). Die Umsatzrate von durchschnittlich 0,65 mol Nitrit/(min\*mg) entsprach 56 % der Umsatzrate von ABA3-CT. Ebenso wie für das Wildtyp-Protein erfolgte der Nachweis des terminalen Schwefels für R723K-CT durch Cyanidbehandlung des Proteins. Hier lag die Menge des cyanolisierbaren

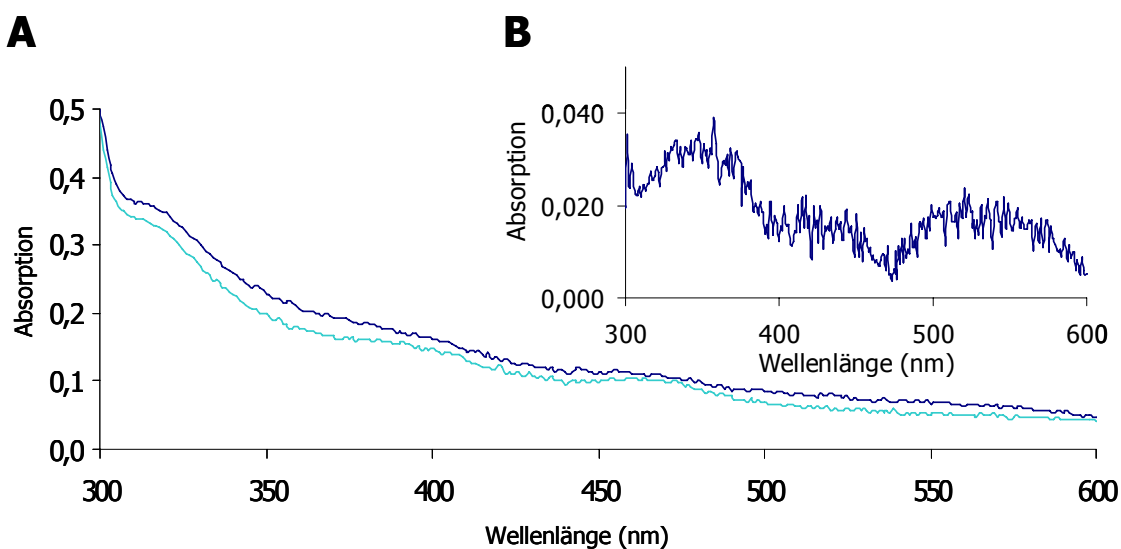
Schwefels unterhalb der Nachweisgrenze oder wies deutlich geringere Werte als bei ABA3-CT auf. Es zeigte sich, dass nur etwa 2-8 % der Gesamtcofaktormenge auf sulfurierten Moco zurückgeführt werden können, wohingegen dieser Anteil bei ABA3-CT mit einem durchschnittlichen Wert von etwa 45 % deutlich höher liegt. Somit führt die *sir3-3*-Mutation nicht nur zu einer schlechteren Cofaktorsättigung als beim Wildtyp-Protein, sondern es zeigte sich darüber hinaus noch eine überproportionale Reduktion des sulfurierten Moco. Dieser Einfluss der Mutation auf die Cofaktorbindung machte eine Beteiligung des mutierten Arginins an der Bindung oder an der Stabilisierung des sulfurierten Moco wahrscheinlich und gab somit einen ersten Hinweis auf ein Moco-Bindemotiv an ABA3-CT. Zusätzlich konnte hierdurch erstmals ein Zusammenhang zwischen der Cofaktorbindung an ABA3-CT und der Funktion von ABA3 als Moco-Sulfurase gezeigt werden. Die Bindung des Moco scheint essentiell für die Funktion des Proteins zu sein. Bei der Umwandlung des Arginins zu einem Lysin handelte es sich um eine relativ schwache Mutation, da zwei basische Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht wurden. Obwohl der Gesamtcofaktorgehalt der Mutante nur um 40 % reduziert ist, könnte die stark reduzierte Menge an sulfuriertem Moco bei R723K-CT die starke, wenn auch nicht vollständige Reduktion der AO- und XDH-Aktivitäten in der *sir3-3*-Mutante erklären.



**Abb. 2-21: Cofaktorbindung an R723K-CT.** A: Prozentualer FormA-Gehalt von R723K-CT im Vergleich zu ABA3-CT (= 100 %; n = 5). B: NADPH NR-Rekonstitution im *nit-1*-Assay mit Zugabe von 10 mM Molybdat in μmol Nitrit/(min\*mg) durch R723K-CT im Vergleich zu ABA3-CT (n = 6).

#### 2.1.14.4 Spektrale Analyse von R723K-CT

Der rekombinante R723K-CT wurde UV/VIS-spektrometrisch vermessen, um eine mögliche Veränderung des Spektrums durch die eingefügte Mutation zu untersuchen. Es zeigten sich für die R723K-CT Variante jedoch die gleichen spektralen Eigenschaften wie bei ABA3-CT. Auch hier wies das aufgenommene Spektrum die charakteristischen Absorptionsbereiche bei 315, 395 und 465 nm auf. Nach Luftoxidation zeigte sich wiederum eine stärkere Ausprägung dieser Absorptionsbereiche (Abb. 2-22A). Das hieraus resultierende Differenzspektrum weist ebenfalls die vom Wildtyp-Protein bekannten Maxima auf (Abb. 2-22B) und verdeutlicht die Ähnlichkeit der spektralen Eigenschaften.



**Abb. 2-22: Spektrale Eigenschaften von R723K-CT.** A: Gezeigt ist das UV/VIS-Spektrum von R723K-CT direkt nach Ni-NTA-Aufreinigung (dunkelblaue Linie) und nach 24 h Oxidation (hellblaue Linie) B: Differenzspektrum der Spektren aus A, die Maxima liegen hier bei 365 nm, 430 nm und zwischen 500-540 nm.

#### 2.1.15 Charakterisierung der ABA3-CT-Varianten ABA3-CT/C542S, ABA3-CT/C755S und ABA3-CT/C758S

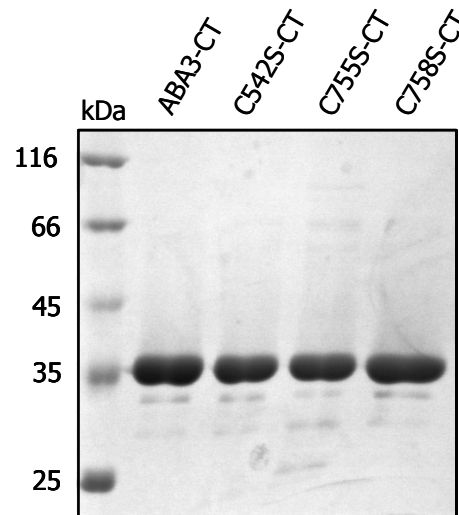
Wie bereits unter 2.1.10 erläutert, weist ABA3-CT neun Cysteine innerhalb seiner Aminosäuresequenz auf, von denen drei unter allen bisher beschriebenen Moco-Sulfurasen strikt konserviert sind und sich auch in insgesamt stark konservierten Sequenzbereichen befinden. Hierbei handelt es sich in der ABA3-CT-Sequenz um ein Cystein an Position 542 und um zwei nahezu benachbarte Cysteine an den Positionen 755 und 758. Die Positionsangaben beziehen sich auf die ABA3-Full-Length-Sequenz. Von den

Molybdoenzymen der SO-Familie ist bekannt, dass proteineigene Cysteine das Molybdän des Moco über die Schwefel-Seitenkette komplexieren. Da bisher noch nicht bekannt war, wie das Molybdän des Moco an den Moco-Sulfurase-C-Termini neben dem cyanolisierbaren Schwefel ligandiert ist, bestand die Möglichkeit, dass eines der konservierten Cysteine an einer solchen Stabilisierung bzw. Bindung des Molybdäns beteiligt ist. In 2.1.10 wurde bereits gezeigt, dass wahrscheinlich lediglich zwei der neun Cysteine exponiert am Protein vorliegen und somit an einem möglichen Persulfidtransfer von ABA3-NifS zu ABA3-CT beteiligt sein könnten.

Um eine eventuelle Rolle der konservierten Cysteine an der Bindung des Molybdäns bzw. des Moco zu untersuchen, sollten Varianten von ABA3-CT erzeugt werden, bei denen jeweils eines dieser Cysteine durch ein Serin ersetzt ist. Durch diesen schwachen Austausch zweier ähnlicher Aminosäuren sollte die Gefahr einer strukturellen Veränderung des gesamten Proteins weitgehend reduziert werden.

#### **2.1.15.1 Klonierung und Expression der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT**

Zur Erzeugung der ABA3-CT-Varianten ABA3-CT/C542S (C542S-CT), ABA3-CT/C755S (C755S-CT) und ABA3-CT/C758S (C758S-CT) wurden alle drei Mutationen über Mutagenese-PCR in die *aba3-CT*-cDNA eingefügt. Hierzu wurden mittels forward- und reverse-Primern, die den entsprechenden Nukleotidaustausch enthielten, zunächst je zwei *aba3-CT*-cDNA-Fragmente amplifiziert, die anschließend über Fusions-PCR zur vollständigen cDNA fusioniert wurden (siehe 4.2.4.2). Die erhaltenen mutierten cDNAs wurden ungerichtet über *Bam*HI-Schnittstellen zunächst in den Vektor pBluescript kloniert, sequenziert und nachfolgend in den Expressionsvektor pQE80 umkloniert. Die Expression und Aufreinigung der ABA3-CT-Varianten erfolgte unter für ABA3-CT optimierten Bedingungen und lieferte für die Varianten C755S-CT und C758S-CT ähnliche Proteinmengen und ähnliche Reinheiten wie für ABA3-CT (Abb. 2-23). Die C542S-CT-Variante zeigte hingegen bisweilen eine etwas geringere Ausbeute an Protein und eine etwas schlechtere Reinheit des rekombinant exprimierten Proteins nach affinitätschromatographischer Aufreinigung im Vergleich zu ABA3-CT und den beiden anderen Varianten. In allen Expressionsansätzen der ABA3-CT-Varianten wurde zusätzlich das Wildtyp-Protein gleichzeitig exprimiert, um auch hier einen direkten Vergleich zwischen parallel exprimierten Proteinen zu ermöglichen.

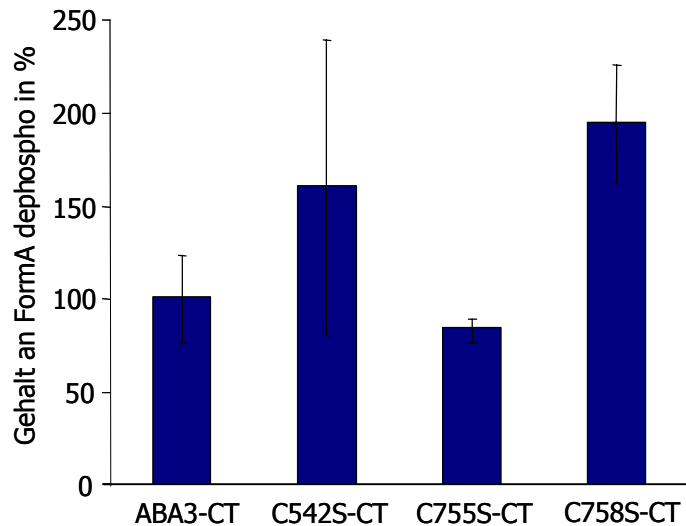


**Abb. 2-23:** SDS-PA-Gelanalyse der affinitätschromatographisch aufgereinigten ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT. Je 10 µg Ni-NTA aufgereinigtes rekombinant exprimiertes ABA3-CT sowie die Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT wurden im 12 %igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt.

#### 2.1.15.2 FormA-Analyse der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT

Um den Einfluss der drei im ABA3-CT konservierten Cysteine auf die Bindung des Cofaktors zu untersuchen, erfolgte zunächst die Bestimmung des Gesamtcofaktorgehaltes aller Varianten mittels FormA-Analyse. Hier zeigte sich bereits, dass der Einfluss der eingefügten Mutationen zu deutlich unterschiedlichen Cofaktorsättigungen an ABA3-CT führte. Die geringste Auswirkung auf die Bindung des Cofaktors zeigte hierbei die Variante C755S-CT, die mit einem durchschnittlichen FormA-Gehalt von 84 % im Vergleich zum Wildtyp-Protein nur eine leicht reduzierte Gesamtcofaktormenge aufwies (Abb. 2-24). Die C758S-CT-Variante wies hingegen stets deutlich höhere FormA-Gehalte auf, die FormA-Mengen lagen hier bei durchschnittlich 194 % im Vergleich zu ABA3-CT, was einer Cofaktormenge von 0,7 mol FormA/mol Protein entspricht. Hier hatte die eingefügte Mutation offensichtlich einen positiven Effekt auf die Bindung oder Stabilisierung des Cofaktors. Der Einfluss der Mutation des Cysteins 542 war im Gegensatz zu den beiden anderen Mutationen nicht ganz eindeutig. Die C542S-CT Variante zeigte abhängig von unterschiedlichen Expressionsansätzen stark variierende Cofaktormengen. In den meisten Expressionsansätzen zeigten sich ähnlich wie bei C758S-CT stark erhöhte FormA-Mengen, jedoch traten auch Cofaktorsättigungen auf, die leicht unter der des Wildtyp-Proteins lagen. Hieraus ergab sich zwar ein durchschnittlicher FormA-Gehalt von 160 % bezogen auf ABA3-CT, jedoch ist dieser Wert mit einer starken Standardabweichung behaftet. Da das rekombinant exprimierte C542S-CT eine etwas

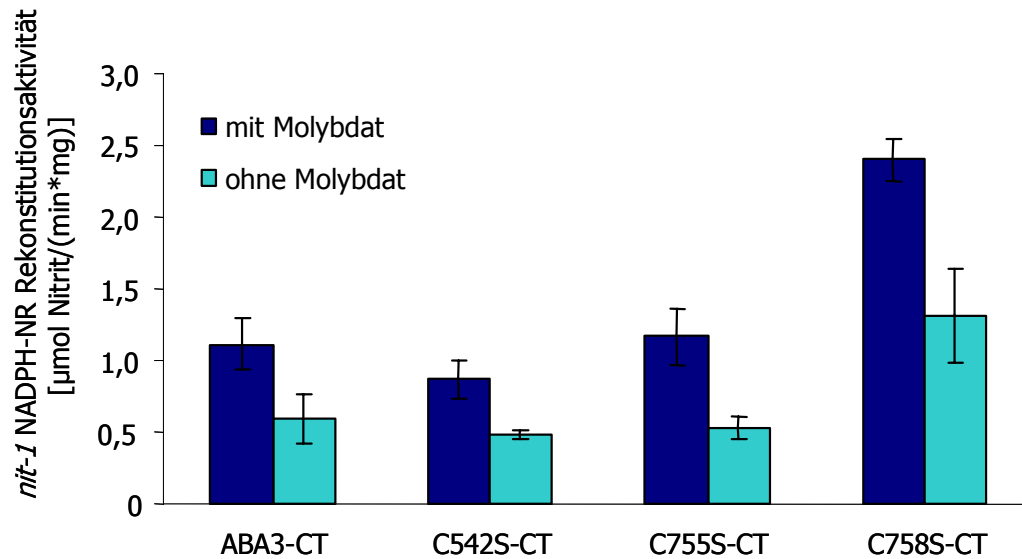
geringere Reinheit und Ausbeute nach Aufreinigung aufwies, könnte die eingefügte Mutation möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Faltung und Stabilität des Proteins insgesamt haben, so dass hier je nach Expressionsansatz eine unterschiedlich gute Bindung des Cofaktors zu beobachten war.



**Abb. 2-24: FormA-Analyse der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT.** Gezeigt sind die FormA-Gehalte der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT. Der FormA-Gehalt wurde prozentual im Vergleich zu ABA3-CT (100 %) angegeben. (C542S-CT: n = 8; C755S-CT: n = 6; C758S-CT: n = 7).

### 2.1.15.3 Biologischer Nachweis von Moco und MPT an C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT im *nit-1* NADPH-NR Rekonstitutions-Assay

Nachdem die Gesamtcofaktormenge für die Varianten durch die FormA-Analyse bestimmt wurde, sollte über die Fähigkeit zur NADPH NR-Rekonstitution im *nit-1*-Assay nachgewiesen werden, ob die Varianten in ähnlicher Weise wie das Wildtyp-Protein neben MPT überwiegend Moco binden, oder ob die eingefügten Mutationen das Binden von anderen Cofaktor-Formen begünstigt. Für die *nit-1*-Rekonstitution wurden jeweils 1 µg der rekombinant exprimierten Proteine eingesetzt und die Rekonstitutionsraten in Abhängigkeit von der Molybdatzugabe ermittelt. Abbildung 2-25 zeigt das Ergebnis des *nit-1*-Assays von vier unabhängigen Expressionen.



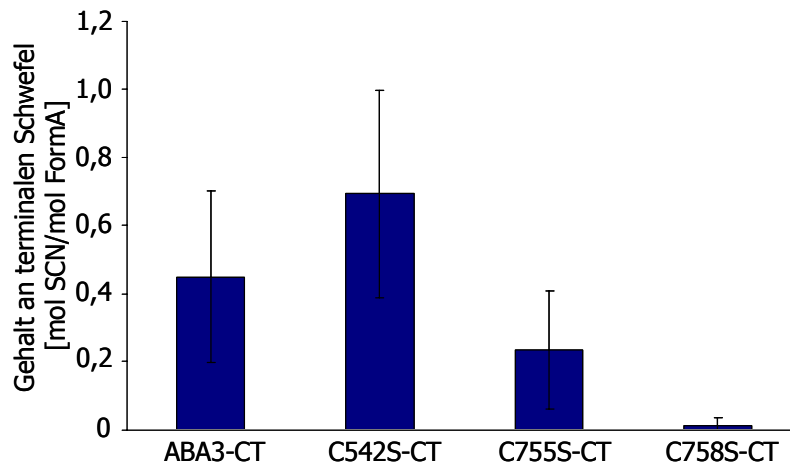
**Abb. 2-25: NADPH NR-Rekonstitution im *nit-1*-Assay der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT.** Gezeigt ist die *nit-1*-Rekonstitutionsrate in  $\mu\text{mol Nitrit}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  durch ABA3-CT und die Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT sowohl nach Zugabe von 10 mM Molybdat (dunkelblaue Balken) als auch ohne Molybdatzugabe (hellblaue Balken); (n = 4).

Alle Varianten waren ebenso wie ABA3-CT sowohl mit als auch ohne Zugabe von Molybdat zur NADPH NR-Rekonstitution in der Lage. Interessanterweise zeigten sich bei allen eingesetzten Proteinen ähnliche Verhältnisse in den Aktivitäten mit und ohne Molybdat. Die *nit-1*-Rekonstitutionsrate der Molybdat-freien Ansätze entsprach bei allen Proteinen 45-55 % der Gesamt-Rekonstitutionsrate, die in den Ansätzen mit Molybdat erzielt wurde. Hieraus kann auf ein nahezu gleiches Moco/MPT-Verhältnis bei allen Proteinen geschlossen werden. Die eingefügten Mutationen begünstigen also weder das Binden des MPT, noch führen sie zu einer noch stärkeren Bevorzugung des Moco. Unterschiede zeigten sich jedoch bei den absoluten NADPH NR-Rekonstitutionsraten. Hier wies C755S-CT mit 1,17 bzw. 0,53 mol Nitrit/(min\*mg) ähnliche Umsatzraten wie das Wildtyp-Protein mit 1,12 bzw. 0,59 mol Nitrit/(min\*mg) auf, wohingegen sich bei C758S-CT mit Umsatzraten von 2,40 und 1,31 mol Nitrit/(min\*mg) erneut eine deutlich höhere Cofaktorbeladung zeigte. Die *nit-1*-Rekonstitutionsraten für C758S-CT entsprachen damit prozentualen Anteilen von 215 bzw. 220 % im Vergleich zu ABA3-CT und lagen somit noch höher als bei der FormA-Analyse. Die *nit-1*-Rekonstitutionsraten für C542S-CT lagen im Gegensatz zur FormA-Analyse annähernd auf dem Niveau des Wildtyp-Proteins (0,87 und 0,49 mol Nitrit/(min\*mg)).



#### **2.1.15.4 Nachweis des terminalen Schwefels am Moco der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT**

Nachdem durch die FormA-Analyse und den *nit-1*-NADPH-NR Rekonstitutionsassay gezeigt werden konnte, dass die erzeugten ABA3-CT-Varianten grundsätzlich in der Lage sind, sowohl MPT als auch Moco zu binden, sollte durch den Thiocyanat-Nachweis geklärt werden, ob die Varianten ebenso wie das Wildtyp-Protein sulfurierten Moco aufweisen. Falls die eingefügten Mutationen ohne Einfluss auf den terminalen Schwefel wären, sollten gleiche Mengen an Thiocyanat pro mol FormA wie bei ABA3-CT bestimmt werden können. Alle Varianten wurden stets parallel zu ABA3-CT mit Cyanid behandelt und anschließend der cyanolisierbare Schwefel quantifiziert. Die Ergebnisse der Thiocyanatbestimmung nach sechs unabhängigen Expressionen sind in Abbildung 2-26 zusammengefasst. Es zeigen sich deutliche Unterschiede im Anteil des sulfurierten Moco an der Gesamtcofaktormenge innerhalb der Varianten. Auffällig ist grundsätzlich, dass es relativ starke Standardabweichungen der Thiocyanatmengen gibt, die darauf schließen lassen, dass der Sulfurierungsstatus des Moco je nach Expressionsansatz stark variiert. Den größten Anteil an sulfuriertem Moco wies mit durchschnittlich 0,69 mol SCN/mol FormA die Variante C542S-CT auf, die somit insgesamt mehr Cofaktor als ABA3-CT bindet und darüber hinaus auch einen höheren Anteil an sulfuriertem Moco aufweist. Gleichzeitig ist diese Variante jedoch auch mit den stärksten Schwankungen innerhalb verschiedener Expressionsansätze behaftet. Ein völlig gegensätzliches Bild zeigte sich bei C758S-CT, der zwar eine auf 200 % erhöhte Cofaktorsättigung zeigte, aber nahezu keinen terminalen Schwefel am Moco aufwies. Die Menge an gebildetem Thiocyanat lag mit durchschnittlich 0,013 mol/mol FormA weit unter den üblichen Mengen des Wildtyp-Proteins. Dies deutet auf eine wichtige Rolle des Cystein 758 für die Stabilisierung des sulfurierten Moco oder für die Bereitstellung eines Persulfid-Schwefels zur terminalen Sulfurierung des Moco hin. Etwa die Hälfte an Thiocyanat im Vergleich zum Wildtyp-Protein konnte für C755S-CT gemessen werden, das durchschnittlich 0,23 mol SCN/mol FormA gebunden hatte, aber ebenfalls große Unterschiede bei verschiedenen Expressionen zeigte.

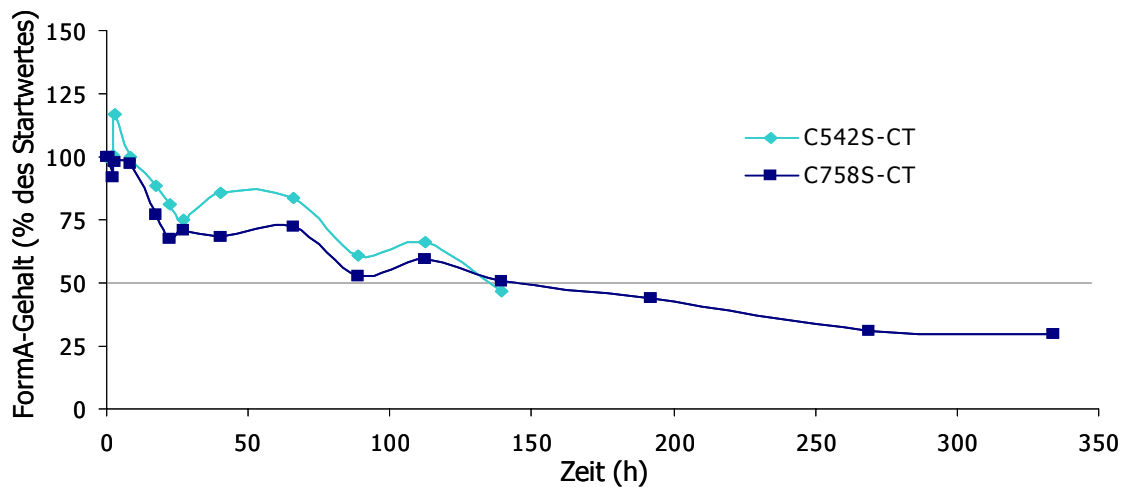


**Abb. 2-26: Nachweis des terminalen Schwefels an den ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT.** Nachweis des terminalen Schwefels am Moco als Thiocyanat nach Cyanidbehandlung. Der Thiocyanat-Gehalt ist in mol SCN/mol FormA angegeben (n = 6).

#### 2.1.15.5 Cofaktorstabilität an den Varianten C542S-CT und C758S-CT

Durch die FormA-Analyse konnte gezeigt werden, dass die rekombinant exprimierten ABA3-CT Varianten C542S-CT und C758S-CT eine wesentlich höhere Cofaktorsättigung als das Wildtyp-Protein aufweisen. Möglicherweise sind diese Varianten besser als das Wildtyp-Protein in der Lage, den gebundenen Cofaktor zu stabilisieren. Über die Bestimmung der Halbwertszeiten für den an diese Varianten gebundenen Cofaktor sollte im Vergleich mit ABA3-CT eine Aussage darüber getroffen werden, ob die beiden Varianten den Cofaktor besser binden. Hierzu wurden Moco-beladener C542S-CT und C758S-CT mit einer Ausgangskonzentration von 10 µg/µl bei 4 °C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots zur Bestimmung des FormA-Gehaltes entnommen. Abbildung 2-27 zeigt die Abnahme des FormA-Gehaltes für die beiden Varianten über die Zeit. Beide Varianten zeigten eine Reduktion des FormA-Gehaltes auf etwa 50 % nach etwa 140 h, was damit der ungefähren Halbwertszeit der Cofaktorbindung an diese Varianten entspricht. Für C542S-CT konnten nur Werte bis zu diesem Zeitpunkt aufgenommen werden, da danach nicht ausreichend Protein zur Verfügung stand, um weitere Messpunkte aufzunehmen. Der ermittelte Wert liegt unter der für das Wildtyp-Protein nachgewiesenen Halbwertszeit für die Cofaktorbindung, die bei 4 °C bei etwa 190 h lag (siehe 2.1.11). Die C758S-CT-Variante weist nach der für ABA3-CT ermittelten Halbwertszeit von 190 h noch 44,1 % des Ausgangs-FormA-Gehaltes und nach 334 h noch etwa 30 % FormA auf (ABA3-CT = 33 %). Somit sind die Halbwertszeiten des Cofaktors an den beiden Varianten der des Wildtyp-Proteins zwar grundsätzlich ähnlich, jedoch eher etwas schlechter und nicht, wie durch die Ergebnisse der

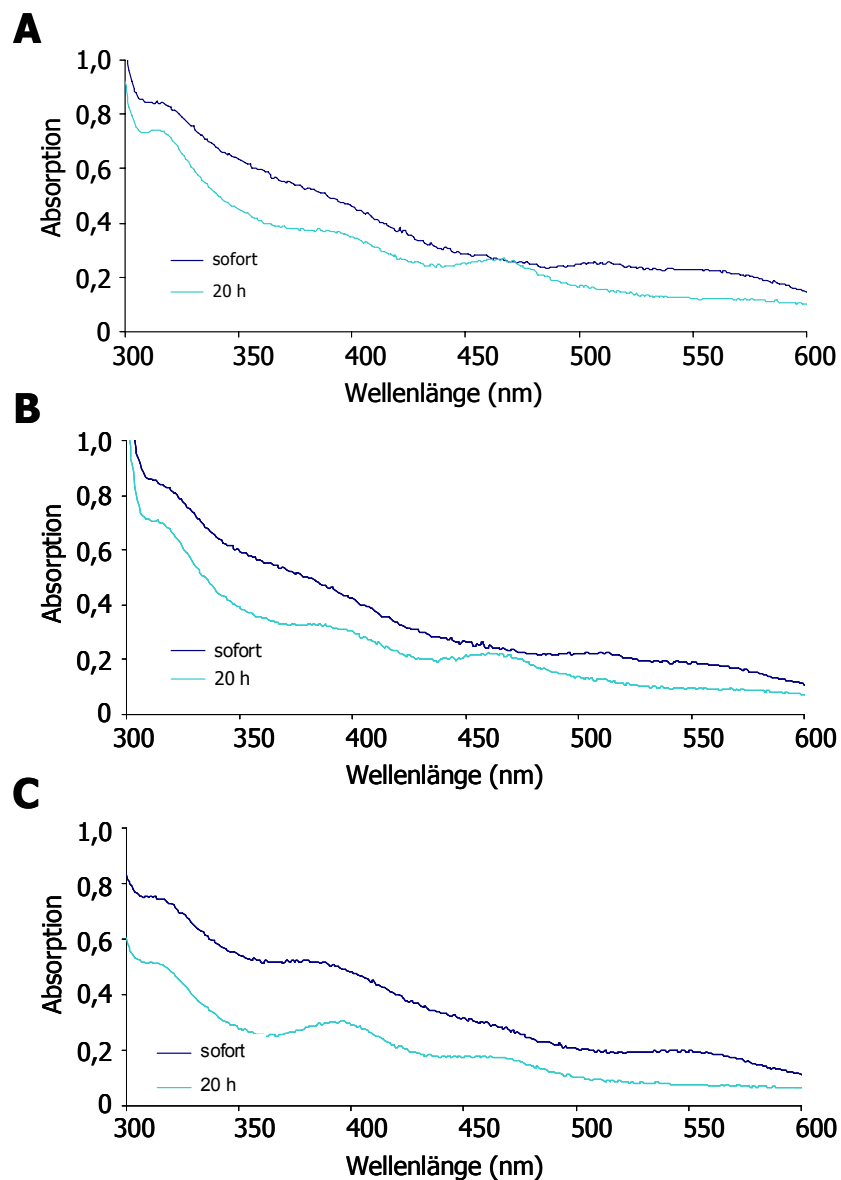
FormA-Bestimmung angedeutet, besser. Die eingefügten Mutationen begünstigen also nicht eine Stabilisierung des gebundenen Cofaktors.



**Abb. 2-27: Bestimmung der Halbwertszeit der Cofaktorbindung an C542S-CT und C758S-CT.** Gezeigt ist die Abnahme des Cofaktorgehaltes bei 4 °C an C542S-CT (hellblaue Linie) über einen Zeitraum von 139 h und an C758S-CT (dunkelblaue Linie) über einen Zeitraum von 334 h. Bei C542S-CT war nach dieser Zeit das restliche Protein präzipitiert, so dass keine weiteren Zeitwerte aufgenommen wurden. Mit 100% wird die FormA-Menge zu Beginn der Inkubation angegeben (n=2).

#### 2.1.15.6 Spektrale Analyse der Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT

Da die eingefügten Mutationen insbesondere bei den Varianten C542S-CT und C758S-CT einen deutlichen Einfluss auf die Cofaktorbeladung und die Art des gebundenen Cofaktors zeigten, stellte sich die Frage nach dem Einfluss dieser Veränderung auf die UV/VIS-Spektren der Proteine. Wie beim Wildtyp-Protein wurden Spektren der drei ABA3-CT-Varianten direkt nach der Expression und nach 20 h Luftoxidation in einem Wellenlängenbereich von 200-900 nm aufgenommen. Grundsätzlich wiesen die Absorptionsspektren aller drei Varianten sowohl direkt nach Aufreinigung als auch nach 20 h Luftoxidation ähnliche Charakteristika auf wie das Wildtyp-Protein (Abb. 2-28A-C). Direkt nach Aufreinigung sind Absorptionen um 315 nm und 395 nm zu erkennen. Auch zeigt sich eine Absorption im Bereich von 500-600 nm. Nach 20 h Oxidation weist das UV/Vis-Spektrum wie bei ABA3-CT Absorptionsmaxima und Schultern bei 315, 395 und 465 nm sowie ein Verlust der Absorption im Wellenlängenbereich von 500-600 nm auf. Das Einfügen der Cystein-Mutationen in das Protein hatte somit keinen signifikanten Einfluss auf die Absorptionseigenschaften des Moco-beladenen ABA3-CT.

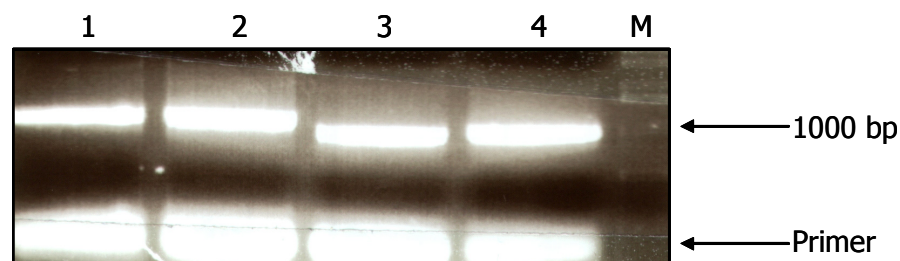


**Abb. 2-28: Spektrale Eigenschaften der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT.** Gezeigt sind die UV/VIS-Spektren der ABA3-CT-Varianten C542S-CT (A), C755S-CT (B) und C758S-CT (C) direkt nach Ni-NTA-Aufreinigung (dunkelblaue Linien) und nach 20 h Luftoxidation (hellblaue Linien).

## 2.2 Charakterisierung der C-terminalen Domäne der humanen Moco-Sulfurase HMCS

### 2.2.1 Klonierung und Expression der C-terminalen Domäne von HMCS

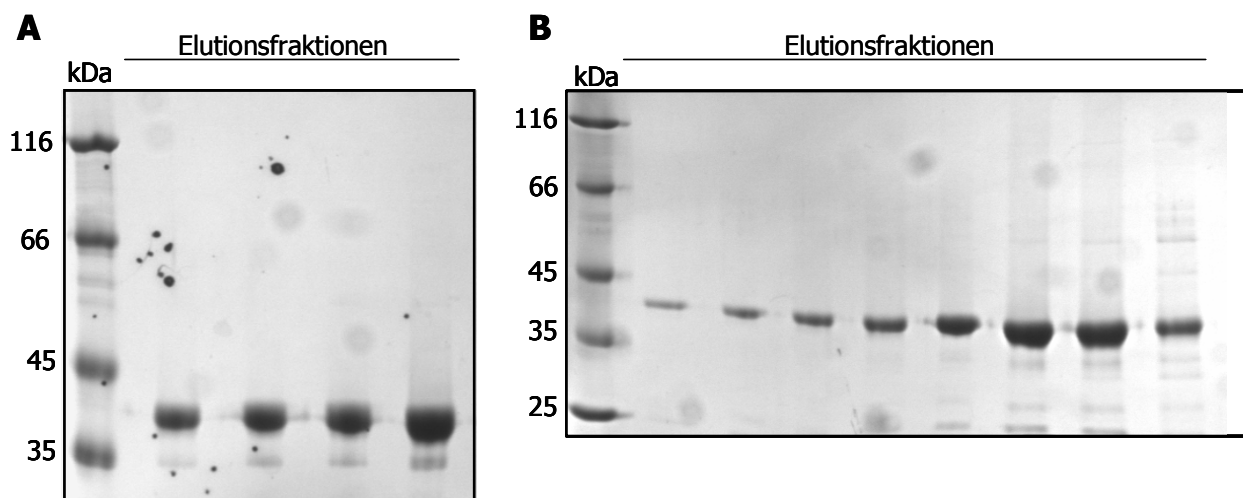
Im Gegensatz zur pflanzlichen Moco-Sulfurase ABA3 war es zu Beginn dieser Arbeit bisher noch nicht gelungen, die humane Moco-Sulfurase HMCS als Full-Length-Protein rekombinant zu exprimieren. Da ein 1,3 kb großes cDNA-Fragment des 3'-Bereiches von *hmcs* nach RT-PCR vorlag (Diplomarbeit Mislav Oreb, 2002), bestand die Möglichkeit ein cDNA-Fragment zur Expression der C-terminalen Domäne von HMCS (HMCS-CT) zu klonieren. Anhand des Aminosäuresequenz-Alignments der bisher bekannten Moco-Sulfurasen (siehe Abb. 2-17) erfolgte eine Einteilung von HMCS in die NifS-ähnliche und die C-terminale Domäne. Zwischen den Sequenzabschnitten der Domänen liegt eine Linker-Region, die einen nicht-konservierten Aminosäureabschnitt umfasst und somit nicht eindeutig einer der beiden Domänen zugeordnet werden kann. Es wurden cDNAs für den C-terminalen Bereich sowohl mit als auch ohne diese Linker-Region kloniert. Die cDNAs mit Größen von 1130 bp (*hmcs-CT1*) und 963 bp (*hmcs-CT2*) konnten amplifiziert (Abb. 2-29) und über *Bam*HI-Schnittstellen in den Vektor pBluescript kloniert werden. Nach Sequenzierung und Umklonierung in den Expressionsvektor pQE80 erfolgte die rekombinante Expression beider HMCS-C-Termini (HMCS-CT1 und HMCS-CT2).



**Abb. 2-29: Amplifizierung der cDNAs von *hmcs-CT1* und *hmcs-CT2*.** Es wurden jeweils die gesamten PCR-Ansätze von *hmcs-CT1* (Spuren 1 und 2) und *hmcs-CT2* (Spuren 3 und 4) auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetragen. Die DNA-Banden mit Größen von ca. 1150 bp (*hmcs-CT1*) bzw. knapp 1000 bp (*hmcs-CT2*) wurden eluiert und kloniert. Die DNA der Spuren 1 und 3 wurde bei 54,5 °C und die der Spuren 2 und 4 bei 58,3 °C amplifiziert. Die unteren Banden resultieren aus überschüssigem Primer (M = DNA-Marker).

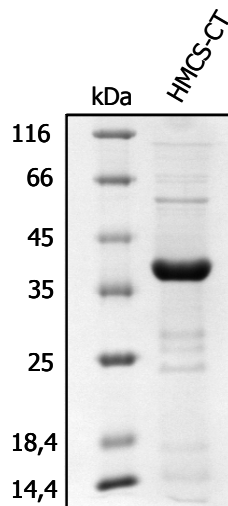
Beide HMCS-C-Termini konnten unter den für ABA3-CT optimierten Expressionsbedingungen exprimiert werden (siehe 2.1.1). Nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung über die Ni-NTA-Matrix zeigte sich jedoch zunächst, dass die HMCS-C-Termini eine geringere Reinheit als das pflanzliche Protein aufwiesen. Allerdings zeigte sich bereits hier eine deutlich dominierende Bande bei etwa 38 kDa, die durch den Anti-His-Tag Antikörper detektiert

wurde (ohne Abbildung). Im Vergleich untereinander wies HMCS-CT2, das Protein ohne die Linker-Sequenz, eine höhere Reinheit als HMCS-CT1 auf. Im Gegensatz zu ABA3-CT zeigten beide HMCS-C-Termini eine gute Stabilität in Tris/HCl- bzw. in Niedrigsalzpuffern und präzipitierten hier nicht, wie es bei ABA3-CT üblich ist. Dies machte die Nutzung von Ionenaustauscherchromatographie möglich. Beide Proteine konnten durch Anionenaustauscherchromatographie und anschließende Gelfiltration soweit aufgereinigt werden, dass das Protein in einzelnen Fraktionen mit einer Größe von etwa 38 kDa elektrophoretisch nahezu rein vorlag (Abb. 2-30).



**Abb. 2-30: SDS-PA Gelanalyse von HMCS-CT1 und HMCS-CT2 nach Aufreinigung durch Anionenaustauscher- und Größenausschlusschromatographie.** Gezeigt sind Aliquots von Elutionsfraktionen von HMCS-CT1 (A) und HMCS-CT2 (B) nach Aufreinigung über eine SourceQ 15 Anionenaustauscher-Säule und über eine Superdex 200 pg Gelfiltrationssäule nach Auftrennung in einem 12 %igen SDS-PA-Gel und Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. Es ist jeweils eine dominierende Bande mit einer Größe von etwa 38-40 kDa angefärbt.

Sowohl das HMCS-CT-Protein mit als auch das ohne Linker-Sequenz konnten somit erfolgreich rekombinant exprimiert werden. In einer ersten FormA-Analyse beider Ni-NTA-aufgereinigten HMCS-CT-Proteine konnte an beiden C-Termini FormA-dephospho und damit eine grundsätzliche Cofaktorbindung nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Da die Linker-Sequenz somit weder für die Stabilität noch für die Cofaktorbindung des rekombinant aufgereinigten HMCS-CT notwendig war, wurde aufgrund der etwas besseren Reinheit nach affinitätschromatographischer Aufreinigung der Linker-freie HMCS-CT2 für die nachfolgenden Analysen eingesetzt und mit HMCS-CT bezeichnet. Die Aufreinigungsbedingungen mittels Ni-NTA-Matrix wurden für dieses Protein soweit optimiert, dass der entsprechend aufgereinigte HMCS-CT für die anschließende Cofaktorcharakterisierung eingesetzt werden konnte (Abb. 2-31).



**Abb. 2-31: SDS-PA-Gelanalyse des affinitätschromatographisch aufgereinigten HMCS-CT.** Gezeigt sind 10 µg des Ni-NTA aufgereinigten rekombinant exprimierten HMCS-CT ohne die Linker-Sequenz nach Auftrennung in einem 12 %igen SDS-PA-Gel und Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue.

### 2.2.2 Charakterisierung der Cofaktorbindung an HMCS-CT

Bereits die vorläufige FormA-Analyse von HMCS-CT1 und HMCS-CT2 wies erstmals nach, dass auch der C-Terminus der humanen Moco-Sulfurase grundsätzlich in der Lage ist, Moco/MPT zu binden. Nach der rekombinanten Expression von HMCS-CT erfolgte daher, ebenso wie zuvor für das pflanzliche Protein ABA3-CT, die Charakterisierung dieser Cofaktorbindung. Hierzu wurde zunächst der Gesamtcofaktorgehalt an HMCS-CT über die FormA-Analyse ermittelt. Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Cofaktorbelastung als bei ABA3-CT (0,35 mol FormA/mol Protein), da im Durchschnitt  $1,79 \pm 0,43$  mol FormA/mol HMCS-CT nachgewiesen werden konnten (Tab. 2-3), was auf die Bindung von bis zu zwei Molekülen Moco/MPT pro Monomer HMCS-CT hindeutete. Da durch die FormA-Analyse nicht zwischen Moco- und MPT-Bindung unterschieden werden kann, wurde die NADPH-NR Rekonstitutionsaktivität für HMCS-CT im *nit-1*-Assay sowohl mit als auch ohne Zugabe von Molybdat ermittelt. HMCS-CT war zur Rekonstitution der NADPH-NR Aktivität unabhängig von der Zugabe von Molybdat befähigt, so dass neben der Bindung des Molybdän-freien MPT auch das Binden des Moco an HMCS-CT nachgewiesen werden konnte (Abb. 2-36). Die Zugabe von Molybdat im *nit-1*-Assay führte jedoch zu einer starken Erhöhung der Rekonstitutionsaktivität, wodurch gezeigt wurde, dass HMCS-CT ebenfalls MPT bindet. Im Vergleich mit dem pflanzlichen Protein zeigte HMCS-CT auch im *nit-1*-Assay deutlich höhere Rekonstitutionsraten, was ebenso wie die FormA-Analyse auf eine höhere Cofaktorsaturierung hindeutete. Um den Anteil des Moco an der Gesamtcofaktormenge bestimmen zu können, erfolgte für HMCS-CT eine Molybdänanalyse mittels ICP-MS. Diese Analyse ergab  $1,42 \pm 0,02$  mol Molybdän/mol HMCS-CT (Tab. 2-3). Damit wurde zum einen die Bindung von bis zu zwei Molekülen Cofaktor pro Monomer HMCS-CT untermauert und zum anderen ließ dies auf einen hohen Anteil von Moco an der Gesamtcofaktormenge

schließen. Durch die Ermittlung des FormA-Gehaltes und der Molybdänanalyse über ICP-MS ergab sich ein Moco-Anteil von nahezu 80 % an der Gesamtcofaktormenge.

Nachdem sowohl die Bindung von Moco als auch MPT an HMCS-CT nachgewiesen werden konnte, sollte gezeigt werden, ob bereits sulfurierter Moco von HMCS-CT gebunden wird. Auch hier erfolgte der Nachweis des terminalen Schwefels am Moco über die Thiocyanatbestimmung nach Cyanidbehandlung des Proteins (siehe 4.4.13). Es konnte terminaler Schwefel in Form von Thiocyanat und damit die Bindung von sulfuriertem Moco an HMCS-CT in allen getesteten Ansätzen nachgewiesen werden. Im Durchschnitt wurden  $0,62 \pm 0,44$  mol Thiocyanat/mol HMCS-CT nachgewiesen (Tab. 2-3). Hieraus ergibt sich ein durchschnittlicher Anteil von 44 % sulfuriertem Moco an der gesamten Moco-Menge.

Da sich für HMCS-CT die Bindung von zwei mol MPT/Moco pro Monomer abzeichnete, bestand die Möglichkeit der Bindung von zwei unterschiedlichen Subspezies des Cofaktors. Der Frage, ob es sich hierbei um sulfurierten und Schwefel-freien Moco handeln könnte, sollte nachfolgend durch Analysen von HMCS-CT-Varianten nachgegangen werden.

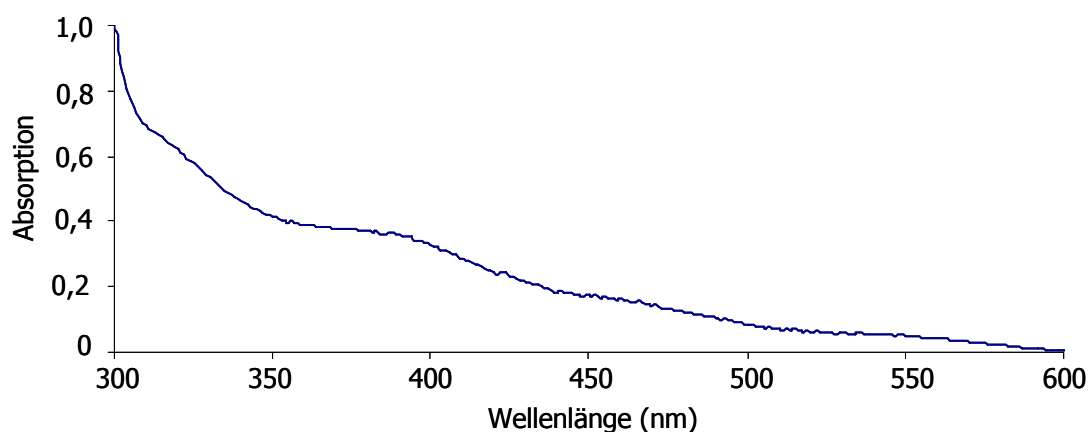
**Tab. 2-3: Charakterisierung des Cofaktors an HMCS-CT.** Gezeigt sind die Anteile unterschiedlicher Cofaktor-Subspezies, die an HMCS-CT gebunden vorliegen. Die MPT-Saturierung bezieht sich auf die Gesamt-Proteinmenge, der Moco-Anteil auf die Gesamtcofaktormenge und der Anteil an sulfuriertem Moco steht in Bezug zum Gesamt-Moco. (FormA-Gehalt:  $n = 9$ ; Molybdängehalt:  $n = 2$ ; Thiocyanat-Bestimmung:  $n = 7$ ).

FormA-Gehalt	Molybdängehalt	Thiocyanat
$1,79 \pm 0,43$ [mol/mol Protein]	$1,42 \pm 0,02$ [mol/mol Protein]	$0,62 \pm 0,44$ [mol/mol Protein]
179 % MPT-Saturierung	79 % Moco	44 % sulfurierter Moco



### 2.2.3 Spektrale Analyse von HMCS-CT

Ebenso wie für ABA3-CT wurde das UV/VIS-Spektrum von HMCS-CT im Wellenlängenbereich von 200-900 nm aufgenommen, um das spezifische Absorptionsverhalten des Moco-beladenen Proteins zu analysieren. Im Wellenlängenbereich bis 300 nm zeigte sich auch hier lediglich das für nahezu alle Proteine typische Absorptionsmaximum bei 280 nm. Da sich auch keine Absorption im Wellenlängenbereich nach 600 nm zeigte, wird der Ausschnitt von 300-600 nm abgebildet (Abb. 2-32). HMCS-CT wies im Vergleich mit ABA3-CT ein Absorptionsspektrum mit wesentlich weniger ausgeprägten Charakteristika auf. Grundsätzlich konnten aber in den gleichen Bereichen wie bei ABA3-CT Absorptionen beobachtet werden, die sich in vier Bereiche einteilen lassen. Eine erste Schulter liegt bei ca. 320 nm und eine zweite zeigt das Maximum bei ca. 395 nm. Ein dritter Absorptionsbereich erstreckt sich von 450-500 nm und ein weiterer im Wellenlängenbereich um 550 nm.

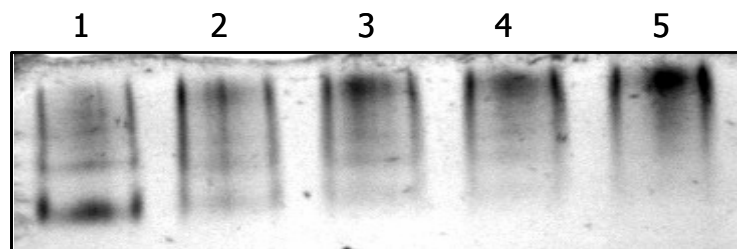


**Abb. 2-32: Spektrale Eigenschaften von HMCS-CT.** Gezeigt ist das UV/VIS-Absorptionsspektrum von HMCS-CT direkt nach Ni-NTA-Aufreinigung. Das Protein zeigt Absorptionen bei etwa 315 nm und 395 nm sowie Schultern im Bereich um 450 nm und um 550 nm.

### 2.2.4 Interaktion von HMCS-CT mit Aldehydoxidase aus Maus

Für Moco-beladenen ABA3-CT konnte eine Interaktion mit den Moco-Sulfurase-Zielproteinen AO und XDH nachgewiesen werden (siehe 2.1.12), die zu einer Überaktivierung dieser Proteine führte. Es sollte gezeigt werden, ob eine solche Interaktion auch bei Moco-beladenem HMCS-CT eintritt. Statt der pflanzlichen Proteine wurde hier eine Maus-AO eingesetzt, die rekombinant in *P. pastoris* exprimiert wurde. Steigende Mengen von HMCS-CT wurden für 30 min bei 22 °C mit Maus-AO coinokubiert. Der anschließenden nativen PAGElektrophorese folgte eine Aktivitätsfärbung mit Indol-3-carboxaldehyd als Substrat (siehe

4.4.14). Die Coinkubation erfolgte unter verschiedenen Pufferbedingungen. Getestet wurde Elutionspuffer, 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 und 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,2. Da das Ergebnis mit allen Pufferbedingungen gleich ausfiel, wird hier stellvertretend die Aktivitätsfärbung nach Coinkubation in Kaliumphosphatpuffer gezeigt (Abb. 2-33). Spur 1 des nativen PA-Gels enthält lediglich 10 µg der rekombinant exprimierten Maus-AO und weist mehrere gefärbte Banden mit einer dominanten Aktivitätsbande im unteren Teil des Gelabschnittes auf. Nach Coinkubation mit HMCS-CT (Spuren 2-5) migriert die dominierende Aktivitätsbande weiter oberhalb im Gel, was eine Interaktion beider Proteine vermuten lässt. Zusätzlich ist eine Zunahme der Intensität dieser Bande mit steigenden Mengen an HMCS-CT zu beobachten. Die Aktivität der Maus-AO lässt sich somit durch steigende Mengen an HMCS-CT erhöhen, wobei es zu einer Interaktion beider Proteine kommt.



**Abb. 2-33:** **Interaktion von HMCS-CT mit Maus-AO.** Gezeigt ist die Aktivitätsfärbung im nativen 7,5 % PA-Gel unter Nutzung des Substrates Indol-3-carboxaldehyd nach Coinkubation von Maus-AO mit HMCS-CT. Ansatz 1 enthält 10 µg Maus-AO, die nachfolgenden Ansätze zusätzlich steigende Mengen an HMCS-CT (10, 20, 35 und 50 µg).

## 2.2.5 Charakterisierung zweier konservierter Motive in HMCS-CT

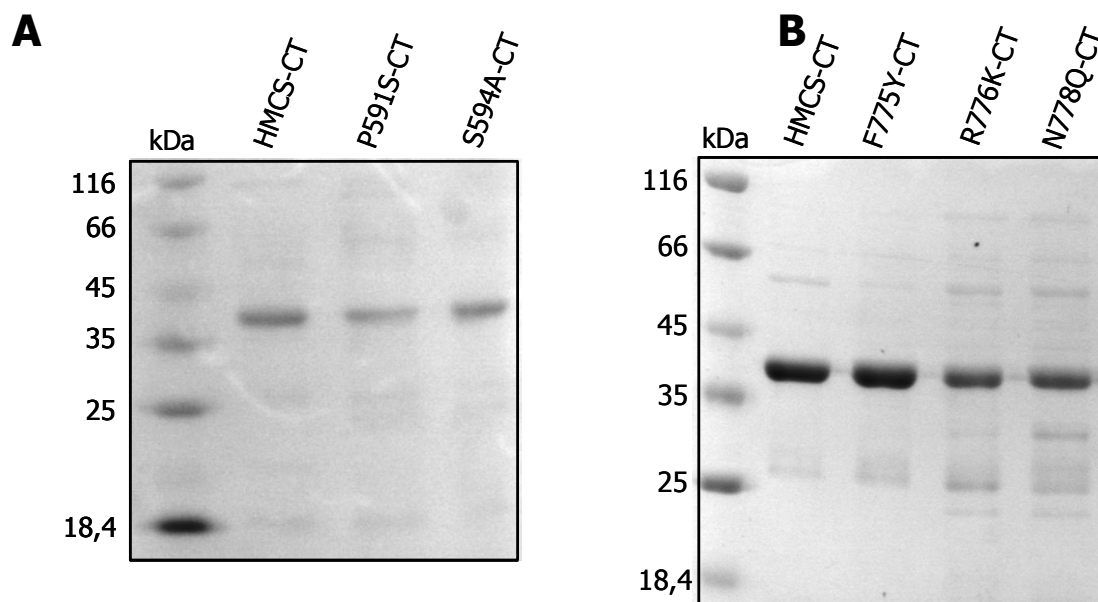
Der Ausfall der Moco-Sulfurase HMCS führt im Menschen aufgrund des gleichzeitigen Aktivitätsausfalls von AO und XDH zur Ausbildung der Xanthinurie Typ II. Zu Beginn dieser Arbeit waren nur Patienten mit Xanthinurie Typ II bekannt, die Mutationen innerhalb der NifS-ähnlichen Domäne von HMCS aufwiesen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden jedoch zwei Mutationen bei Xanthinurie Typ II-Patienten bekannt, die innerhalb der C-terminalen Domäne von HMCS auftraten (Peretz *et al.*, 2006 und Hava Peretz, persönliche Mitteilung). Hierdurch wurde auch für die humane Moco-Sulfurase die Relevanz der C-terminalen Domäne für die Aktivierung der Molybdoenzyme der XO-Familie *in vivo* nachgewiesen. Bei den C-terminalen Mutationen handelte es sich um den Austausch eines Arginins durch ein Cystein an der Aminosäuresequenz-Position 776 (Peretz *et al.*, 2006) und um den Austausch eines Prolins an Position 591 durch ein Serin (Hava Peretz, persönliche Mitteilung), wobei sich die Positionsangaben auf das Full-Length-Protein beziehen. Beide Mutationen führten in

den Patienten zu einem Aktivitätsausfall der Moco-Sulfurase und damit von AO und XDH. Die betroffenen Aminosäuren sind in allen bisher charakterisierten Moco-Sulfurasen strikt konserviert und befinden sich in ebenfalls strikt konservierten Aminosäuresequenzabschnitten (Abb. 2-17). Das mutierte Arginin 776 in HMCS entspricht hierbei interessanterweise dem Arginin 723 in ABA3, das in der *A. thaliana*-Mutante *sir3-3* durch ein Lysin ersetzt ist (siehe 2.1.14). Da für beide Mutationen bisher noch nicht bekannt war, warum sie zu einem Ausfall der Moco-Sulfurase-Aktivität führen, sollte der Einfluss dieser Mutationen auf den Cofaktor von HMCS über die Erzeugung und Charakterisierung rekombinant exprimierter HMCS-CT-Varianten untersucht werden. Zusätzlich zu den HMCS-CT-Varianten, die die Patientenmutationen widerspiegeln, sollten weitere Varianten innerhalb der umgebenden konservierten Aminosäurebereiche generiert und untersucht werden, um möglicherweise Motive identifizieren zu können, die für die Bindung des Cofaktors verantwortlich sind. Grundsätzlich wurden hierbei „schwache“ Austausche mit ähnlichen Aminosäuren vorgenommen, um den Einfluss der Mutationen auf die Proteinstruktur und damit auf die Stabilität des Proteins weitgehend zu minimieren. Das erste untersuchte Motiv erstreckt sich von Aminosäure 587-598 mit invariablen Resten an den Positionen 590 und 591 sowie 593-595 (Abb. 2-17). Aus diesem Motiv wurde die Variante HMCS-CT/P591S (P591S-CT) kloniert, die der Mutation einer der Patienten entspricht (Hava Peretz, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus wurde die Variante HMCS-CT/S594A (S594A-CT) erzeugt. Das zweite konservierte Motiv erstreckt sich von Aminosäure 775-781 mit hoch konservierten Resten an den Aminosäurepositionen 775, 776 und 778 (Abb. 2-17). Da es sich bei der im anderen Patienten aufgetretenen Mutation um den „starken“ Aminosäureaustausch eines Arginins gegen ein Cystein handelt (Peretz *et al.*, 2006), der die Gefahr struktureller Veränderungen des Proteins birgt, wurden für diese Position zwei Varianten erzeugt. Neben der Variante HMCS-CT/R776C (R776C-CT), die der Patientenmutation entspricht, wurde das Arginin 776 auch gegen ein Lysin ausgetauscht. Diese R776K-CT-Variante von HMCS-CT entspricht dabei der R723K-CT-Variante von ABA3, die die *sir3-3*-Mutation widerspiegelt. Zur Charakterisierung der beiden weiteren Positionen wurden die Varianten HMCS-CT/F775Y (F775Y-CT) und HMCS-CT/N778Q (N778Q-CT) kloniert.

### **2.2.5.1 Klonierung und Expression der HMCS-CT-Varianten**

Die Erzeugung aller HMCS-CT-Varianten erfolgte über Mutagenese-PCR. Die gewünschten Mutationen wurden mittels forward- und reverse-Primern, die den entsprechenden

Nukleotidaustausch enthielten, in die *hmcs-CT*-cDNA eingefügt, so dass zunächst zwei *hmcs-CT*-cDNA-Fragmente amplifiziert wurden. Diese wurden nachfolgend über Fusions-PCR zur vollständigen cDNA fusioniert (siehe 4.2.4.2) und ungerichtet über *Bam*HI-Schnittstellen in den Vektor pBluescript kloniert. Nach Sequenzierung erfolgte anschließend die Umklonierung in den Expressionsvektor pQE80. Die Expression und Aufreinigung der Varianten wurde unter den für HMCS-CT optimierten Expressionsbedingungen durchgeführt. Für alle Versuchsansätze wurde stets das Wildtyp-Protein parallel exprimiert. Die Varianten der beiden konservierten Motive wurden dabei unabhängig voneinander charakterisiert und der entsprechend parallel exprimierte HMCS-CT als Referenz verwendet. Abbildung 2-34 zeigt die SDS-PA-Gelanalyse der affinitätschromatographisch aufgereinigten HMCS-CT-Varianten beider Motive mit den dazugehörigen Wildtyp-Proteinen. Es wird deutlich, dass beide Varianten des ersten Motivs (P592S-CT und S594A-CT) eine ähnliche Reinheit wie das Wildtyp-Protein aufweisen. Bei den Varianten des zweiten Motivs wies lediglich die F775Y-CT-Variante ähnliche Reinheiten wie das Wildtyp-Protein auf, R776K-CT und N778Q-CT wurden in etwas schwächeren Mengen exprimiert und zeigten auch stärkere Verunreinigungen als HMCS-CT. Nachfolgend wurden die Varianten aus beiden Motiven im Hinblick auf ihre Cofaktorbindung analysiert.

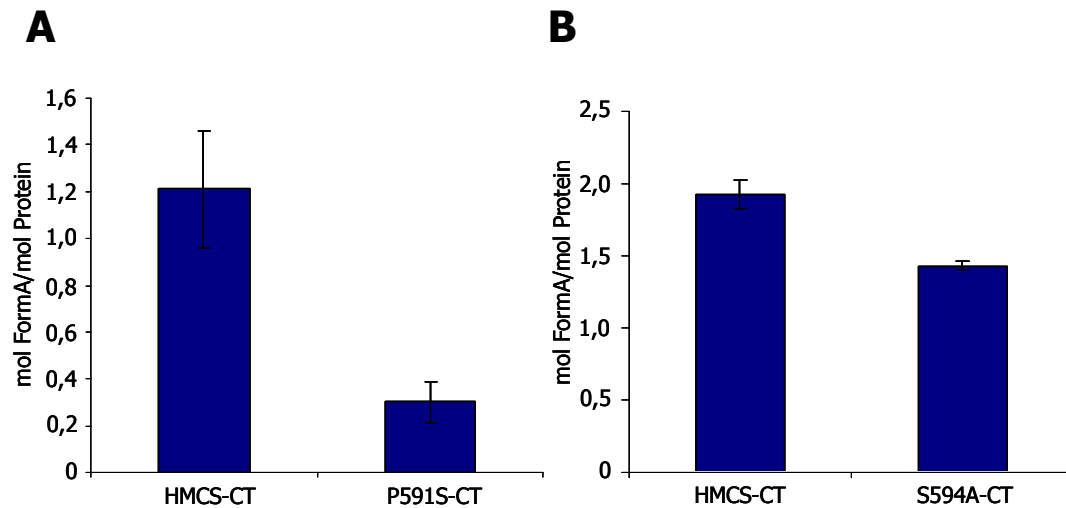


**Abb. 2-34: SDS-PA-Gelanalyse der affinitätschromatographisch aufgereinigten HMCS-CT-Varianten.** Je 3 µg Ni-NTA aufgereinigter rekombinant exprimierter HMCS-CT sowie die Varianten P591S-CT und S594A-CT (A) bzw. je 6 µg Ni-NTA aufgereinigter rekombinant exprimierter HMCS-CT sowie die Varianten F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT (B) wurden im 12 %igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt.

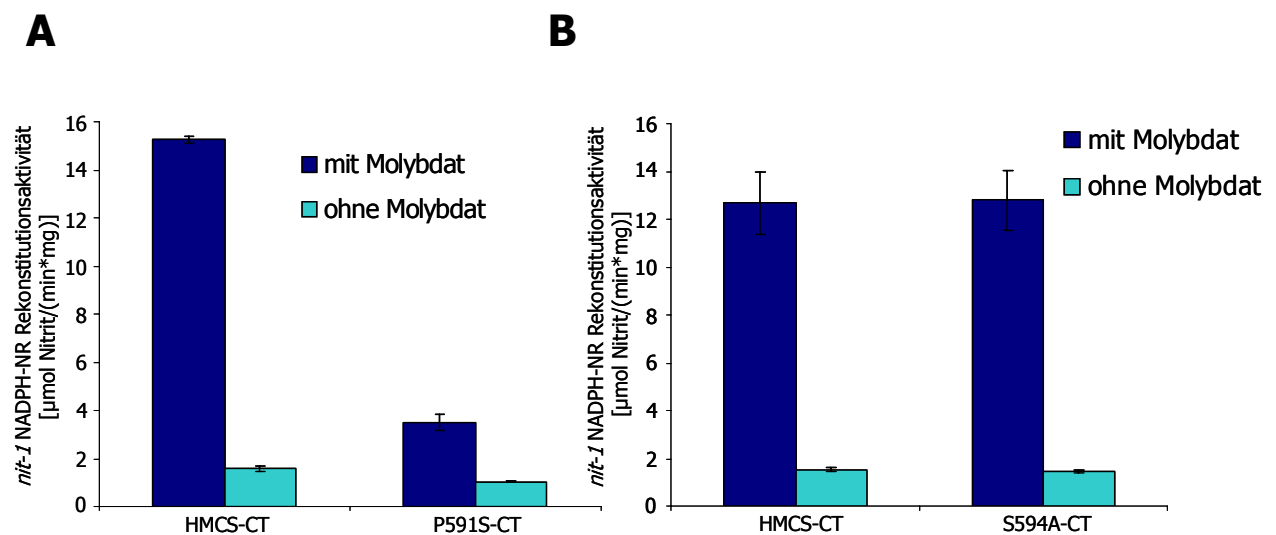
### 2.2.5.2 Charakterisierung der Cofaktorbindung an den HMCS-CT-Varianten P591S-CT und S594A-CT

Der MPT/Moco-Gehalt wurde mittels FormA-Analyse und die Moco-abhängige NR-Komplementationsrate mit Hilfe des *nit-1*-Assays untersucht. Außerdem wurde der Sulfurierungsgrad des Moco analysiert. Da beide mutierten Proteine in unabhängigen Expressionen jeweils zusammen mit HMCS-CT als Kontrolle exprimiert wurden, weist das Kontrollprotein für beide Varianten unterschiedliche FormA- und NADPH-NR Rekonstitutionsraten auf.

Um den Einfluss der Patientenmutation an Position 591 und die Bedeutung des umgebenden konservierten Motivs auf die Cofaktorbindung zu untersuchen, wurde die Gesamtcofaktormenge der rekombinant exprimierten Proteine im Vergleich zum Wildtyp-Protein bestimmt. Die FormA-Analyse ergab für die P591S-CT-Variante 0,3 mol FormA/mol Protein und wies damit einen auf 24 % reduzierten Gesamtcofaktorgehalt im Verhältnis zu HMCS-CT auf (Abb. 2-35A). Einen wesentlich geringeren, aber dennoch deutlichen Einfluss zeigte die S594A-Mutation. Die ermittelte FormA-Menge entsprach 74 % der mitgeführten HMCS-CT-Kontrolle (Abb. 2-35B). Eine deutlich reduzierte Cofaktormenge an der P591S-CT-Variante konnte auch durch die NADPH-NR Rekonstitution im *nit-1*-Assay nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden für HMCS-CT und seine Varianten sowohl Komplementationsversuche mit Molybdat, als auch ohne Molybdat gemacht. Für die Ansätze mit Molybdat wurden jeweils 0,1 µg Ni-NTA-aufgereinigtes Protein und für die Ansätze ohne Molybdat jeweils 0,2 µg Protein eingesetzt. Es wurde pro Ansatz eine 3-fach Bestimmung durchgeführt. P591S-CT zeigte nach Zugabe von Molybdat eine Rekonstitutionsaktivität von  $3,5 \pm 0,34$  µmol Nitrit/(min\*mg), was 23 % der Wildtyp-Protein-Aktivität entspricht und somit mit der FormA-Analyse korreliert (Abb. 2-36A). Grundsätzlich war P591S-CT auch ohne Zugabe von Molybdat zur Rekonstitution der NADPH-NR Aktivität in der Lage, wodurch die Bindung von Moco an der Variante nachgewiesen wurde. Auch hier lagen die erzielten Aktivitäten mit  $1,04 \pm 0,04$  µmol Nitrit/(min\*mg) jedoch unter denen des Wildtyp-Proteins, das eine Rekonstitutionsaktivität von  $1,6 \pm 0,12$  µmol Nitrit/(min\*mg) aufwies. Zusammen mit den Ergebnissen der FormA-Analyse konnte somit ein negativer Einfluss der im Patienten auftretenden Mutation auf die Bindung des Cofaktors nachgewiesen werden. Die S594A-CT-Variante zeigte hingegen im *nit-1*-Assay mit Aktivitäten von  $12,79 \pm 1,45$  µmol Nitrit/(min\*mg) bei Molybdatzugabe bzw. von  $1,23 \pm 0,08$  µmol Nitrit/(min\*mg) ohne Molybdatzugabe (Abb. 2-36B) ähnliche Rekonstitutionsaktivitäten wie der mitgeführte HMCS-CT ( $12,67 \pm 1,51$  µmol Nitrit/(min\*mg) mit Molybdatzugabe und  $1,31 \pm 0,09$  µmol Nitrit/(min\*mg) ohne Molybdatzugabe).



**Abb. 2-35: FormA-Analyse der HMCS-CT-Varianten P591S-CT und S594A-CT.** Dargestellt sind die FormA-Gehalte in mol FormA/mol Protein der HMCS-CT-Varianten P591S-CT (A) und S594A-CT (B) im Vergleich zu HMCS-CT (n = 3).



**Abb. 2-36: NADPH NR-Rekonstitution im *nit-1*-Assay der HMCS-CT-Varianten P591S-CT und S594A-CT.** Gezeigt ist die *nit-1*-Rekonstitutionsrate in µmol Nitrit/(min\*mg) durch HMCS-CT und die Varianten P591S-CT (A) und S594A-CT (B) sowohl mit Zugabe von 10 mM Molybdat (dunkelblaue Balken) als auch ohne Molybdatzugabe (hellblaue Balken), (n = 3).

Wie die Abbildung 2-36 zeigt, sind die Varianten P591S-CT und S594A-CT in der Lage, sowohl mit als auch ohne Molybdat den *nit-1*-Extrakt zu rekonstituieren. Das zeigt, dass am C-Terminus dieser Varianten sowohl Moco als auch Molybdän-freies MPT vorhanden sein muss. Allerdings ist P591S-CT sowohl mit als auch ohne Molybdat nur stark reduziert zur *nit-1*-Komplementation in der Lage, was die Reduktion der durch FormA-Analyse ermittelten MPT/Moco-Mengen belegt. Durch die Bestimmung des cyanolisierbaren Schwefels sollte nachfolgend geklärt werden, wie groß der Anteil des Moco in der sulfurierten Form ist.

Die für die Varianten bestimmten Thiocyanatmengen der unterschiedlichen Testreihen zeigten hierbei jedoch deutliche Unterschiede, so dass keine zufrieden stellenden Mittelwerte gebildet werden konnten (Tab. 2-4). Die Werte für den cyanolisierbaren Schwefel beider Varianten lagen stets deutlich unter 1 mol SCN<sup>-</sup>/mol FormA, was auf eine teilweise, aber niemals vollständige Sulfurierung des Moco hinweist. Die Mengen des cyanolisierbaren Schwefels an der Variante P591S-CT wiesen im Vergleich mit HMCS-CT in den unterschiedlichen Testreihen sowohl reduzierte als auch erhöhte Werte auf.

Für die Variante S594A-CT wurden hingegen durchgehend reduzierte Thiocyanatmengen im Vergleich mit HMCS-CT ermittelt. Während für P591S-CT daher keine zuverlässige Aussage über den Sulfurierungsstatus des Moco getroffen werden kann, bindet S594A-CT offenbar weniger sulfurierten Moco als HMCS-CT.

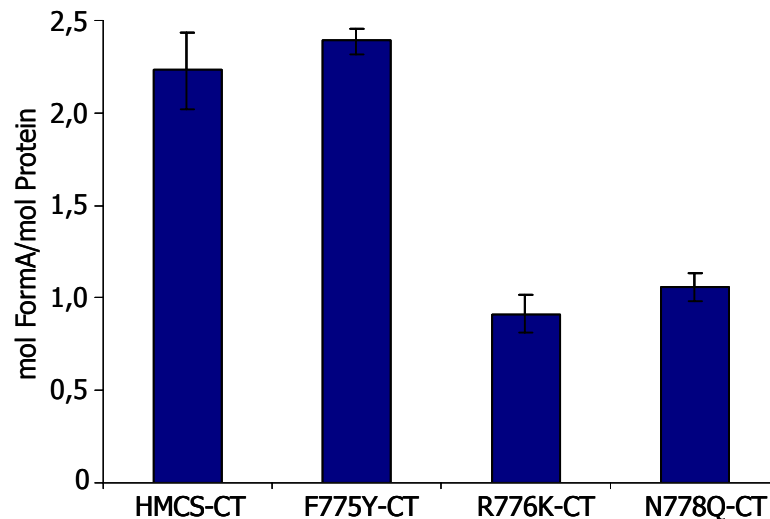
**Tab. 2-4: Nachweis des terminalen Schwefels an den HMCS-CT-Varianten P591S-CT, und S594A-CT.** Nachweis des terminalen Schwefels am Moco von HMCS-CT, P591S-CT und S594A-CT als Thiocyanat nach Cyanidbehandlung. Der Thiocyanat-Gehalt ist in mol SCN<sup>-</sup>/mol FormA angegeben. In drei unabhängigen Testreihen wurde die Thiocyanatmenge der C-Termini mit unterschiedlicher Häufigkeit (1-3x) bestimmt.

	mol SCN <sup>-</sup> /mol FormA		
	1. Testreihe	2. Testreihe	3. Testreihe
<b>HMCS-CT</b>	0,367 und 0,275	0,156	0,49 und 0,27
<b>P591S-CT</b>	0,190	0,682 und 0	0
<b>S594A-CT</b>	0,174	0,110 und 0,091	0,27, 0,32 und 0,16

### 2.2.5.3 Charakterisierung der Cofaktorbindung an den HMCS-CT-Varianten F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT

Die Charakterisierung der HMCS-CT-Varianten des zweiten konservierten Motivs umfasste wie beim ersten Motiv die Bestimmung des MPT/Moco-Gehaltes mit Hilfe der FormA-Analyse und des *nit-1*-NADPH-NR Rekonstitutions-Assays. Der Anteil des terminalen Schwefels wurde in mol SCN<sup>-</sup>/mol FormA nachgewiesen. Zusätzlich wurde für die Varianten des zweiten Motivs der Molybdängehalt der Proteine mittels ICP-MS bestimmt, um Aussagen über den Anteil von Moco an der Gesamtofaktormenge treffen zu können. Die HMCS-CT-Varianten des zweiten Motivs wurden in drei unabhängigen Expressionen jeweils zusammen mit einem Kontrollprotein exprimiert.

Durch die FormA-Analyse konnten deutlich unterschiedliche Cofaktormengen an den Varianten im Vergleich zu HMCS-CT nachgewiesen werden. Für die R776K-CT-Variante wurde ein FormA-Gehalt von 0,91 mol FormA/mol Protein und für die N778Q-CT-Variante ein FormA-Gehalt von 1,06 mol FormA/mol Protein bestimmt, was einer Reduktion auf 41 % bzw. 48 % entspricht. Die Variante F775Y-CT zeigte hingegen mit 107 % einen dem HMCS-CT-Kontrollprotein vergleichbaren MPT/Moco-Gehalt (Abb. 2-37).

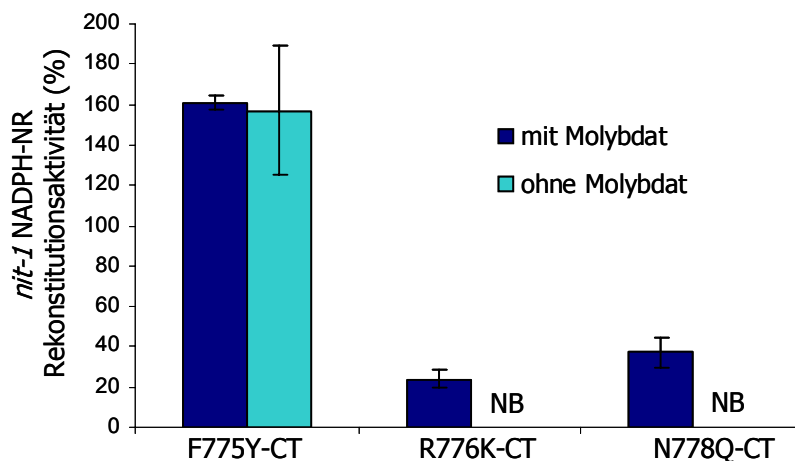


**Abb. 2-37: FormA-Analyse der HMCS-CT-Varianten R776K-CT, F775Y-CT und N778Q-CT.** Gezeigt sind die FormA-Gehalte in mol FormA/mol Protein der HMCS-CT-Varianten R776K-CT, F775Y-CT und N778Q-CT im Vergleich zu HMCS-CT (n = 3).

Zum biologischen Nachweis von Moco und MPT an den Varianten des zweiten Motivs wurden für die Ermittlung der Rekonstitutionsaktivität im *nit-1*-Assay Komplementationsversuche mit und ohne Molybdat durchgeführt. Für die Ansätze mit Molybdat wurden wiederum 0,1 µg und für die Ansätze ohne Molybdat 0,2 µg Ni-NTA-gereinigtes Protein eingesetzt. Da die spezifischen Rekonstitutionsaktivitäten von HMCS-CT und den Varianten bei den drei Expressionen recht unterschiedlich waren, wurden die spezifischen Aktivitäten prozentual auf HMCS-CT (= 100 %) bezogen, so dass die Tendenzen der Varianten gegenüber HMCS-CT verdeutlicht werden (Abb. 2-38). Bei den Komplementationsversuchen mit Molybdat, die sowohl MPT als auch Moco nachweisen können, wies die F775Y-CT-Variante mit 161 % eine deutlich höhere Komplementationsrate als das Wildtyp-Protein auf. Die übrigen beiden Varianten zeigten im Gegensatz zu HMCS-CT wie bei der FormA-Analyse reduzierte Aktivitäten. Hierbei zeigte R776K-CT mit 24 % die geringste Aktivität. Die Variante N778Q-CT wies eine Komplementationsrate von 37 % auf. In den Komplementationsversuchen ohne Molybdat-Zugabe wurden für die F775Y-CT-Variante mit 157 % im Vergleich zu HMCS-CT ebenfalls stark erhöhte Aktivitäten bestimmt. Die Varianten R776K-CT und N778Q-CT zeigten

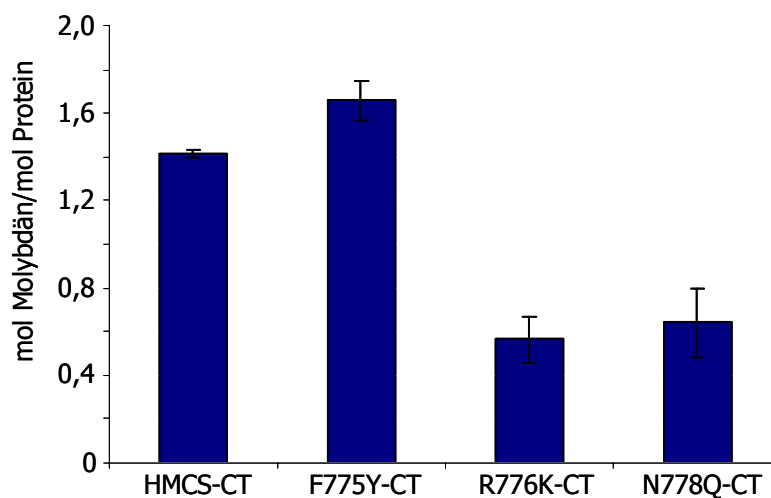


auch ohne Molybdatzugabe eine geringe Rekonstitutionsaktivität, allerdings lagen die erhaltenen Absorptionswerte dieser Varianten hierbei unterhalb des linearen Bereichs der Nitritbestimmung, so dass ihre *nit-1*-Rekonstitutionsaktivitäten im Vergleich zu HMCS-CT nicht berechnet werden konnten. Da die Varianten des zweiten Motivs unabhängig von der Molybdät-Zugabe jedoch grundsätzlich in der Lage sind, den *nit-1*-Extrakt zu rekonstituieren, muss demnach, trotz aller Unterschiede zum Kontrollprotein, sowohl Moco als auch Molybdän-freies MPT an den Proteinen gebunden sein.



**Abb. 2-38: NADPH NR-Rekonstitution im *nit-1*-Assay von F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT.** Gezeigt sind die *nit-1*-Rekonstitutionsraten der HMCS-CT-Varianten F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT sowohl mit 10 mM Molybdat (dunkelblaue Balken) als auch ohne Molybdat (hellblaue Balken). Die spezifischen Aktivitäten wurden prozentual auf HMCS-CT (= 100 %) bezogen (n = 3). NB = nicht bestimmbar; die Absorptionen liegen unterhalb des linearen Bereich der Kalibriergerade.

Um den Anteil des Moco an der Gesamtofactormenge bestimmen zu können, wurden die Molybdän-Konzentrationen der Varianten F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT mittels ICP-MS bestimmt. Die ermittelten Molybdänkonzentrationen korrelierten dabei bei allen Varianten mit den zuvor bestimmten Werten der FormA-Analyse (siehe Abb. 2-37). Wie in 2.2.2 beschrieben, wurden für HMCS-CT durchschnittlich 1,42 mol Molybdän/mol Protein nachgewiesen. Die Variante F775Y-CT zeigte mit 1,66 mol Molybdän/mol Protein einen auf 117 % erhöhten Wert (Abb. 2-39). Die beiden Varianten R776K-CT und N778Q-CT waren hingegen im Molybdän-Gehalt reduziert, wodurch die Ergebnisse des Molybdat-freien *nit-1*-Assays bestätigt wurden. Für die R776K-CT-Variante wurden 0,57 und für die N778Q-CT-Variante 0,64 mol Molybdän/mol Protein detektiert, was im Vergleich zu HMCS-CT 40 % bzw. 45 % entspricht.



**Abb. 2-39: Molybdän-Bestimmung an HMCS-CT, F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT.** Gezeigt sind die mittels ICP-MS bestimmten Molybdän-Gehalte von HMCS-CT, F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT in mol Molybdän/mol Protein (n = 2).

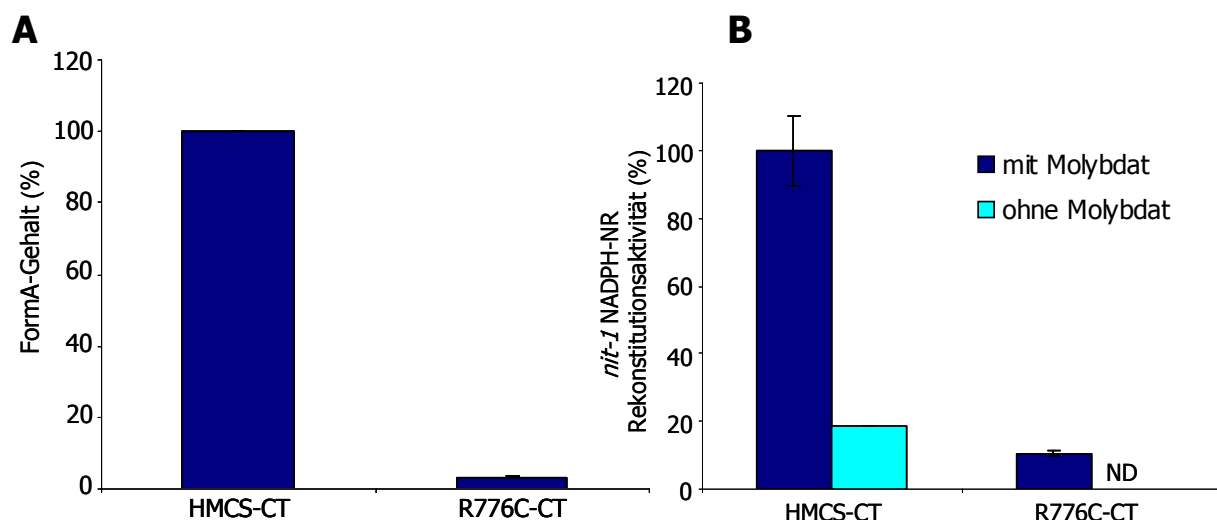
Die Bestimmung des cyanolisierbaren Schwefels an der Variante F775Y-CT erwies sich als ähnlich problematisch wie bei den Varianten des ersten Motivs. Auch hier zeigten sich widersprüchliche Tendenzen. Je nach Versuchsansatz war die bestimmte Thiocyanatmenge und damit der Anteil an terminalem Schwefel im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder erhöht, so dass keine zufrieden stellenden Aussagen zum Sulfurierungsstatus getroffen werden konnten (Tab. 2-5). Grundsätzlich lag jedoch auch hier die Thiocyanatkonzentration stets unter 1 mol SCN<sup>-</sup>/mol FormA, so dass der gebundene Moco in teilweise sulfurierten Zustand vorgelegen haben muss. Für die Varianten R776K-CT und N778Q-CT konnte hingegen kein cyanolisierbarer Schwefel am Moco in Form von Thiocyanat nachgewiesen werden.

**Tab. 2-5: Nachweis des terminalen Schwefels an den HMCS-CT-Varianten F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT.** Nachweis des terminalen Schwefels am Moco von HMCS-CT, F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT als Thiocyanat nach Cyanidbehandlung. Der Thiocyanat-Gehalt ist in mol SCN<sup>-</sup>/mol FormA angegeben. In zwei unabhängigen Testreihen wurde die Thiocyanatmenge der C-Termini mit unterschiedlicher Häufigkeit (1-2x) bestimmt.

	mol SCN <sup>-</sup> /mol FormA	
	1. Testreihe	2. Testreihe
<b>HMCS-CT</b>	0,156	0,090
<b>F775Y-CT</b>	0,101 und 0,014	0,281
<b>R776K-CT</b>	0 und 0	0 und 0
<b>N778Q-CT</b>	0 und 0	0

#### 2.2.5.4 Charakterisierung der Cofaktorbindung an der Xanthinurie Typ II verursachenden Variante HMCS-CT/R776C-CT

Bereits für die HMCS-CT-Variante R776K-CT, die einen schwachen Aminosäureaustausch aufweist, konnte ein deutlicher Einfluss der eingefügten Mutation auf die Bindung des Cofaktors nachgewiesen werden (2.2.5.3). Diese HMCS-CT-Variante zeigte hierbei ähnliche Eigenschaften wie die korrespondierende ABA3-CT-Variante R723K-CT (siehe 2.1.14). Die *A. thaliana*-Mutante *sir3-3*, der diese Mutation mit schwachem Aminosäureaustausch zu Grunde liegt, weist zwar einen starken jedoch nicht vollständigen Verlust der AO- und XDH-Aktivitäten auf. Im Gegensatz hierzu zeigen die Xanthinurie Typ II-Patienten mit der Mutation R776C keinerlei Restaktivitäten von Molybdoenzymen der XO-Familie. Wie aus Abbildung 2-40 hervorgeht, hat diese Mutation einen drastischen Einfluss auf die Gesamtofactormenge, die durch das R776C-CT-Protein gebunden werden kann. Die FormA-Menge dieser Variante ist im Vergleich zum Wildtyp auf 3 % reduziert. Die Reduktion spiegelt sich auch in den Rekonstitutionsraten des *nit-1*-Assays wider. Die Aktivität der Variante liegt bei Molybdatzugabe bei 10,5 % des Wildtyp-Proteins, Moco konnte im Assay ohne Molybdatzugabe nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnte bei der Thiocyanat-Bestimmung kein terminaler Schwefel an R776C-CT gefunden werden (ohne Abbildung). Die Ergebnisse zeigen somit eine insgesamt drastische Reduktion der Cofaktormenge, die offenbar ausschließlich durch Molybdän-freies MPT repräsentiert wird. Die völlige Abwesenheit von sulfuriertem Moco könnte somit den in Patienten auftretenden Phänotyp erklären und untermauert die Relevanz dieses strikt konservierten Arginins für die Funktion der Moco-Sulfurase.

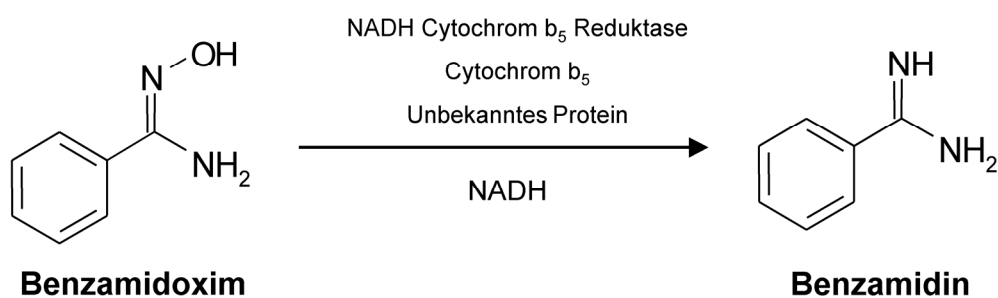


**Abb. 2-40: Cofaktoranalyse von R776C-CT.** Gezeigt sind der FormA-Gehalt (A) und die NADPH NR-Aktivität im *nit-1*-Assay (B) mit und ohne Zugabe von Molybdat der HMCS-CT-Variante R776C-CT. Die Werte sind prozentuale Anteile im Vergleich mit HMCS-CT (= 100 %); (FormA-Analyse: n = 4; *nit-1*-Assay: n = 3, ND = nicht detektierbar).

## **2.3 Charakterisierung von zum Moco-Sulfurase C-Terminus homologen Proteinen**

### **2.3.1 Identifizierung des *N*-reduktiven Systems**

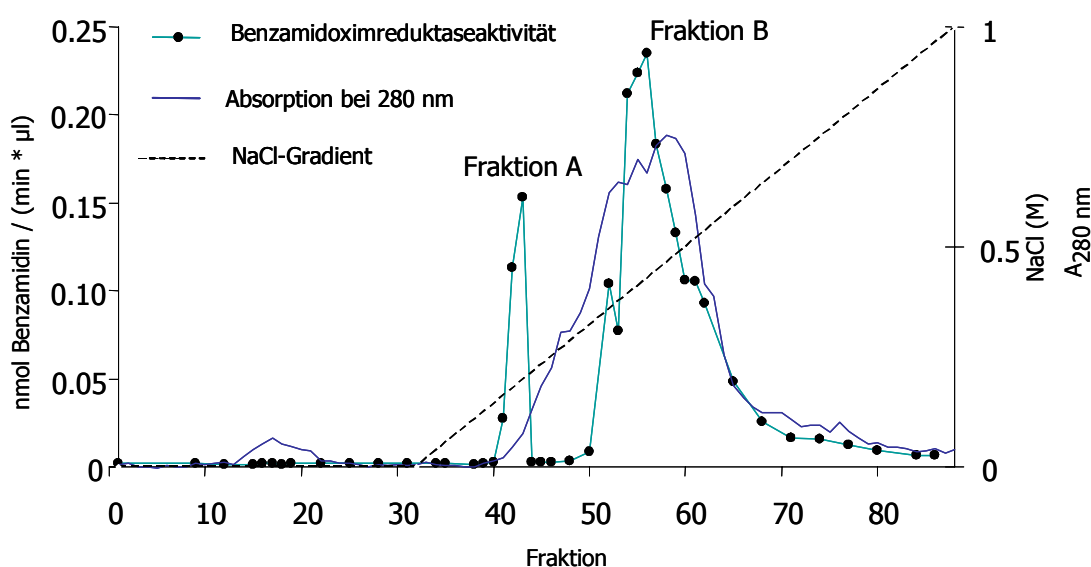
Anfang 2006 gelang der Arbeitsgruppe um Prof. Bernd Clement am Pharmazeutischen Institut der Universität Kiel die Isolation eines zum C-Terminus von HMCS homologen Proteins aus der äußeren Membran von Schweinelebermitochondrien. Das Protein wurde durch ESI-MS identifiziert und wird in den Datenbanken als „Moco Sulphurase C-terminal domain containing 2“ bezeichnet (Protein Accession: NP\_060368). Es wurde dabei gezielt nach Proteinen bzw. Proteinfractionen gesucht, die zusammen mit Cytochrom  $b_5$  und Cytochrom  $b_5$ -Reduktase in der Lage sind, *N*-hydroxylierte Amidoxime in einer NADH-abhängigen Reaktion zu den korrespondierenden Amidinen zu reduzieren. Amidinstrukturen sind in zahlreichen Wirkstoffklassen vertreten, wie z.B. in Arzneistoffen mit antikoagulativer (Peterlin-Masic *et al.*, 2006; Hauptmann *et al.*, 2002) oder mit leishmanizider oder trypanozider Wirkung, ebenso sind sie Bestandteil von Wirkstoffen gegen Pneumocystis-Pneumonie (Clement *et al.*, 2002). Aufgrund ihrer starken Basizität ( $pK_s \sim 11$ ; Gustafson *et al.*, 2001) liegen Amidine bei einem physiologischen pH-Wert jedoch als hydrophile Amidiniumkationen vor und können in dieser Form nicht vom Gastrointestinaltrakt absorbiert werden. Diese Basizität kann durch *N*-Hydroxylierung gesenkt werden, wodurch ein oral bioverfügbarer Stoff entsteht, der im Gastrointestinaltrakt überwiegend als freie Base vorliegt und somit absorbiert werden kann (Clement *et al.*, 2002; Ettmayer *et al.*, 2004). *N*-hydroxylierte Amidine stellen somit eine Klasse von Prodrugs dar, die erst durch Biotransformation in den aktiven Wirkstoff Amidin überführt werden. Das Hauptorgan der Biotransformation ist die Leber, die die meisten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme enthält. Als ein Modellsubstrat für die Umwandlung von Amidoximen zu Amidinen fungiert Benzamidoxim, das die *N*-hydroxylierte Struktur des Benzamidins darstellt (Abb. 2-41). Benzamidoxim wurde auch als Substrat zur Identifizierung des dritten unbekannten Proteins des Amidoxim-reduzierenden Systems (auch *N*-reduktives System) verwendet. Basierend auf seiner Fähigkeit Amidoxime zu reduzieren, wurde das durch Havemeyer *et al.* (2006) isolierte Enzym in „mitochondrial Amidoxime Reducing Component“ (mARC) umbenannt.



**Abb. 2-41: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch das mitochondrielle *N*-reduktive System.**

Die Isolation der dritten Komponente des *N*-reduktiven Systems erfolgte durch die Aufreinigung von Fraktionen der äußeren Membran von Schweineleber-Mitochondrien, die eine besonders hohe Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität aufwiesen.

Über Anionenaustauscherchromatographie solubilisierter mitochondrialer Proteine konnten zwei Fraktionen eluiert werden (Abb. 2-42), die im rekonstituierten System mit Cytochrom  $b_5$  und seiner Reduktase *N*-reduktive Eigenschaften aufwiesen (Havemeyer *et al.*, 2006). Diese Fraktionen wurden als Fraktion A und B bezeichnet, wobei Fraktion A frei von Cytochrom  $b_5$  und seiner Reduktase war. Beide Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Im Coomassie-gefärbten Gel zeigte Fraktion A nur zwei Proteinspots mit Größen von 60 kDa und 35 kDa, wobei der größere Spot als Monoamin-Oxidase B identifiziert werden konnte. Die ESI-Analyse des 35 kDa großen Spots und nachfolgende Datenbankrecherchen (BlastP) ordneten dem Spot das als „Moco Sulphurase C-terminal containing 2“ bezeichnete hypothetische Protein zu. Diese Bezeichnung erfolgte aufgrund der Homologie des hypothetischen Proteins zu den C-Termini der Moco-Sulfurasen.

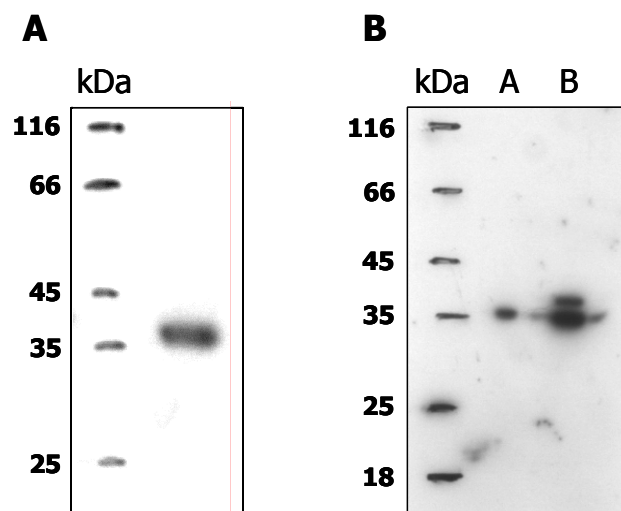


**Abb. 2-42: Elutionsprofil der Benzamidoximreduktase-haltigen Fraktionen nach Anionenaustauscher-Chromatographie an DEAE-Cellulose.** Fraktion A und B: Proteinfractionen mit *N*-reduktiver Aktivität, Fraktion A ist frei von Cytochrom  $b_5$  und seiner Reduktase. Die Chromatographie erfolgte durch A. Havemeyer (Universität Kiel)

### 2.3.2 Western-Analyse der *N*-reduktiven Fraktionen

Da das in Kiel isolierte mitochondrielle Protein signifikante Sequenzhomologien zu den C-Termini der Moco-Sulfurasen aufweist, sollte eine weitergehende Charakterisierung des Enzyms erfolgen. Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob es neben den Homologien auf Aminosäuresequenzebene auch eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem aus Schweineleber isoliertem mARC und den Moco-Sulfurasen C-Termini gibt. Hierzu wurde ein aufgereinigter und gegen rekombinanten ABA3-CT gerichteter Antikörper gegen die Fraktionen A und B verwendet (Abb. 2-43B). In vorhergehenden Western-Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass der gegen ABA3-CT gerichtete Antikörper auch mit rekombinatem HMCS-CT kreuzreagiert und diesen spezifisch nachweist (Abb. 2-43A).

Es zeigte sich, dass der Antikörper in beiden Fraktionen spezifisch das als „Moco Sulphurase C-terminal domain containing 2“ bezeichnete Protein mit einer Größe von 35 kDa erkennt. Die Kreuzreaktion des gegen ABA3-CT gerichteten Antikörpers mit mARC weist auf eine strukturelle Ähnlichkeit beider Proteine hin.



**Abb. 2-43: Western-Analyse der aus der OMV von Schweinelebermitochondrien aufgereinigten Fraktionen mit *N*-reduktiver Aktivität.** A: Western-Analyse von HMCS-CT durch gegen ABA3-CT gerichteten Antikörper, B: Nutzung des anti-ABA3-CT Antikörpers gegen die Fraktion A (1 µg) und B (5,5 µg) aus der OMV von Schweinelebermitochondrien, die sich durch besonders hohe *N*-reduktive Aktivitäten auszeichnen.

### 2.3.3 Biologischer Nachweis von Moco/MPT in den mitochondrialen Fraktionen mit *N*-reduktiver Aktivität im *nit-1*-NADPH-NR Rekonstitutions-Assay

Nachdem durch die Western-Analyse gezeigt wurde, dass mARC auch auf struktureller Ebene den C-Termini von ABA3 und HMCS ähnlich ist, sollte untersucht werden, ob mARC ebenfalls in der Lage ist, Moco/MPT zu binden. Hierzu wurden sowohl eine Fraktion der äußeren Mitochondrienmembran (outer membrane vesicles = OMV) als auch Aliquots der aufgereinigten Fraktionen A und B im *nit-1*-Assay (siehe 4.4.16) auf ihre Fähigkeit zur Rekonstitution der NADPH-NR-Aktivität untersucht (Tab. 2-6).

**Tab. 2-6: Rekonstitution der NADPH NR-Aktivität im *nit-1*-Assay durch die Fraktionen A und B.** Die Moco-abhängige Rekonstitution wurde durch die Coinkubation des *N. crassa nit-1* Extraktes mit den entsprechenden mitochondrialen Fraktionen bestimmt (n = 2).

Protein-Fraktion	$\mu\text{mol NO}_2^- / (\text{min} * \text{mg Protein})$
äußere Membranfraktion (OMV)	$0,057 \pm 0,02$
Fraktion A	$2,08 \pm 0,24$
Fraktion B	$0,15 \pm 0,02$

Tabelle 2-6 zeigt die Moco-abhängige „*nit-1*-Aktivität“ sowohl in der OMV-Fraktion, als auch in den aufgereinigten Fraktionen A und B. Somit konnte nachgewiesen werden, dass alle untersuchten mitochondrialen Fraktionen Moco-bindendes Protein enthalten, wobei die rekonstituierte Aktivität in Fraktion A wesentlich höher ausfiel als in Fraktion B. Ausgehend von der bestimmten NR-Aktivität ergibt sich ein Anreicherungsfaktor der *nit-1*-Rekonstitutionsaktivität von 46 in der Fraktion A gegenüber der OMV-Fraktion. Dies korrespondiert mit der von A. Havemeyer berechneten Zunahme der *N*-reduktiven Aktivität um das 43-fache. Bei Fraktion B hingegen liegt nur eine etwa 2,5-fache Anreicherung (ausgehend von der OMV-Fraktion) vor, die nicht den Anstieg der *N*-reduktiven Aktivität um das 30-fache widerspiegelt (Dissertation Antje Havemeyer, 2006).

### 2.3.4 *N*-reduktive Aktivität von HMCS-CT

Da gezeigt werden konnte, dass mARC aus Schweinelebermitochondrien ein neues Moco-bindendes Protein darstellt und somit weitere Ähnlichkeiten zu ABA3-CT und HMCS-CT

aufweist, wurde HMCS-CT als Säugerprotein auf *N*-reduktive Aktivität getestet. HMCS-CT wurde in den *E. coli*-Expressions-Stämmen TP1000, RK5204 und RK5206 exprimiert, um einen möglichen Einfluss der Cofaktorbindung auf die *N*-reduktive Aktivität zu untersuchen. Im *E. coli*-Stamm TP1000 wird der Moco in seiner eukaryotischen Form akkumuliert, hingegen binden Proteine, die im RK5206-Stamm exprimiert werden, ausschließlich MPT und solche aus dem RK5204-Stamm können keinerlei Cofaktor binden. Diese HMCS-C-Termini wurden über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und über SDS-PAGE auf Reinheit überprüft. Alle C-Termini wurden in einem Ansatz mit Benzamidoxim, NADH, Cytochrom  $b_5$  und seiner Reduktase getestet. Gebildetes Benzamidin wurde über HPLC-Analyse nachgewiesen. Es zeigte sich, dass der Moco-bindende HMCS-CT tatsächlich Benzamidoxim zu Benzamidin umsetzte und somit auch *N*-reduktive Aktivität aufwies (Tab. 2-7). Sowohl der Cofaktor-freie als auch der MPT-bindende C-Terminus zeigten hingegen keinerlei enzymatische Aktivität, wodurch die strikte Abhängigkeit der *N*-reduktiven Aktivität vom gebundenen Moco nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurde untersucht, ob diese Aktivität vom zugesetzten Co-Substrat NADH abhängt. Der Moco-haltige HMCS-CT war in der Lage, auch ohne NADH-Zugabe Benzamidoxim zu reduzieren, wobei hier die spezifische Aktivität jedoch deutlich niedriger war.

**Tab. 2-7: Nachweis der *N*-reduktiven Aktivität für HMCS-CT.** 135 µg des entsprechenden rekombinant exprimierten HMCS-CT wurden mit 0,5 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0 inkubiert. Die Messung der *N*-reduktiven Aktivität erfolgte durch A. Havemeyer (Universität Kiel).

<i>E. coli</i> Expressions-Stamm	Co-Substrat	Spezifische Aktivität [nmol/(min*mg)]
TP1000	0,5 mM NADH	0,48 ± 0,04
TP1000	ohne NADH	0,23 ± 0,01
RK5206	0,5 mM NADH	ND
RK5204	0,5 mM NADH	ND

In einem Kontrollansatz wurde schließlich HMCS-CT ohne die beiden anderen Komponenten des *N*-reduktiven Systems, Cytochrom  $b_5$  und Cytochrom  $b_5$ -Reduktase, eingesetzt. Überraschenderweise zeigte auch hier HMCS-CT die Fähigkeit Benzamidoxim zu Benzamidin zu reduzieren. Somit konnte HMCS-CT alleine grundsätzlich das aus drei Komponenten bestehende *N*-reduktive System ersetzen.



### 2.3.5 *N*-reduktive Aktivität der HMCS-CT-Varianten F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT

Nachdem die *N*-reduktive Aktivität für den Wildtyp von HMCS-CT nachgewiesen werden konnte, sollten die HMCS-CT-Varianten F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT aus dem zweiten zuvor charakterisierten konservierten Motiv (siehe 2.2.5.3) auf die Fähigkeit zur Benzamidoximreduktion getestet werden. Wie sich zeigte, ist dieses FRXN-Motiv nicht nur unter allen bisher bekannten Moco-Sulfurasen, sondern auch unter den neu identifizierten mARC-Homologen strikt konserviert (Abb. 2-44). Alle Varianten wurden wie der Wildtyp im *E. coli*-Stamm TP1000 exprimiert und somit in der Moco-haltigen Form verwendet. Es wurden jeweils 270 µg der HMCS-CT-Varianten in einem Ansatz mit Cytochrom  $b_5$  und seiner Reduktase eingesetzt. NADH wurde als Cosubstrat in einer Konzentration von 1 mM zugefügt. In einem zweiten Testansatz wurden die Proteinmengen auf gleiche FormA-Mengen angepasst.

**Tab. 2-8:** *N*-reduktive Aktivitäten der HMCS-CT-Varianten F775Y-CT, R776K-CT und N778Q-CT. Gleiche Proteinmenge: 270 µg des entsprechenden rekombinant exprimierten Proteins wurden in einem Ansatz mit 1 mM NADH und 0,5 mM Benzamidoxim verwendet. Gleiche FormA-Mengen: die Proteine wurden auf eine gleiche FormA-Menge von  $5,2 \cdot 10^{-9}$  mol FormA angeglichen und mit 1 mM NADH und 0,5 mM Benzamidoxim vermessen (beide:  $n = 4$ ).

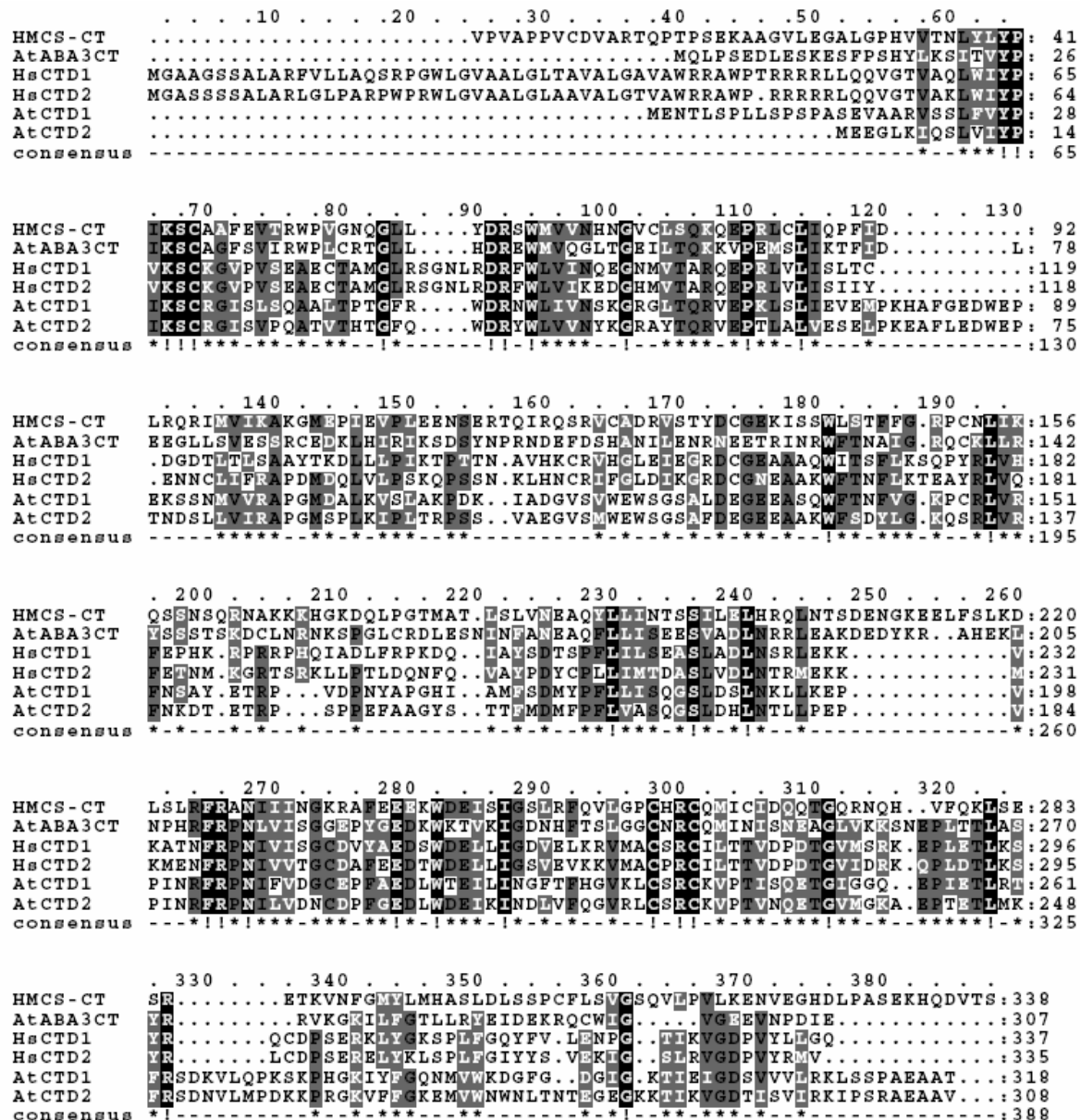
Variante	Reduktaseaktivität [nmol Benzamidin/(min*mg)] Gleiche Proteinmenge	Reduktaseaktivität [nmol Benzamidin/(min*molFormA)] Gleiche FormA-Menge
HMCS-CT	0,288 ± 0,013	4338883 ± 912923
F775Y-CT	0,031 ± 0,003	673695 ± 166269
R776K-CT	ND	ND
N778Q-CT	0,003	ND

Bei Einsatz gleicher Proteinmengen wies das HMCS-CT-Wildtyp-Protein die höchste *N*-reduktive Aktivität auf. Alle Mutationen des konservierten Motivs zeigten einen negativen Einfluss auf die *N*-reduktive Aktivität (Tab. 2-8). Lediglich die F775Y-CT-Variante zeigte eine etwa 10 %ige Restaktivität im Vergleich zum Wildtyp. Für die Variante R776K-CT konnte keine *N*-reduktive Aktivität detektiert werden und für N778Q-CT lag die Reduktaseaktivität an der Grenze der Nachweisbarkeit. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei Einsatz von auf gleichen FormA-Gehalt angepassten Proteinmengen, wodurch die deutlich reduzierten Moco-Beladungen der R776K-CT und N778Q-CT Varianten (siehe 2.2.5.3) ausgeglichen werden sollten. Für beide Varianten konnte auch hier keine Reduktaseaktivität nachgewiesen

werden. Für die F775Y-CT-Variante, die eine leicht erhöhte Moco-Beladung im Vergleich zum Wildtyp aufweist, betrug sie 16 % der Reduktaseaktivität von HMCS-CT.

### 2.3.6 Isolierung der humanen mitochondrial Amidoxime Reducing Component-Homologen 1 und 2 (mARC-Homologe 1 und 2)

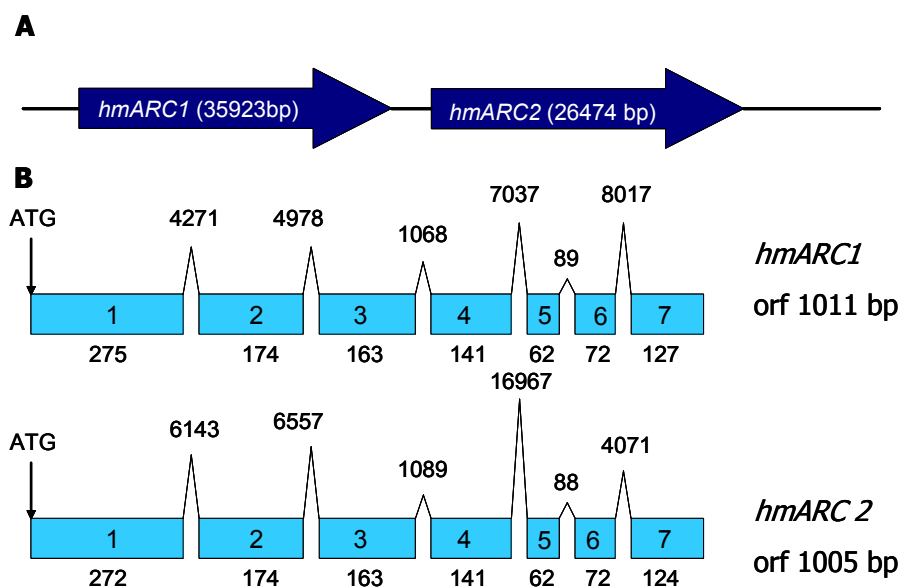
Aufgrund von Datenbankanalysen konnten sowohl in *A. thaliana* als auch im Menschen je zwei mARC-homologe Proteine (mARC-Homolog 1 und 2) identifiziert werden (Abb. 2-44).



**Abb. 2-44:** Sequenz-Alignment von HMCS-CT, ABA3-CT und den mARC-homologen Proteinen aus *A. thaliana* und *H. sapiens*. Das Alignment wurde mit Hilfe von „ClustalW at PBIL“ von Pôle Bioinformatique Lyonnais erstellt und durch „Boxshade“ in die vorliegende Form gebracht; At CTD1 = Homolog 1 aus *A. thaliana*; At CTD2 = Homolog 2 aus *A. thaliana*; Hs CTD1 = humanes Homolog 1; Hs CTD2 = humanes Homolog 2.

HMCS-CT weist über die gesamte Aminosäuresequenz eine Identität von 20 % und eine Ähnlichkeit von 32 % zum humanen mARC-Homolog1 (hmARC1) auf. Mit dem humanen mARC-Homolog2 (hmARC2) teilt es eine Identität von 19 % und eine Ähnlichkeit von 34 %. Untereinander zeigen beide humanen mARC 66 % Identität und 79 % Ähnlichkeit (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Beide Gene der humanen mARC-Proteine sind in Tandemorientierung auf dem menschlichen Chromosom 1 lokalisiert und nur durch 2672 bp voneinander getrennt. Die Gene besitzen jeweils sieben Exons von sehr ähnlicher Größe und auch insgesamt ähneln die Exon-Intron-Strukturen von *hmARC1* und *hmARC2* einander stark (Abb. 2-45).

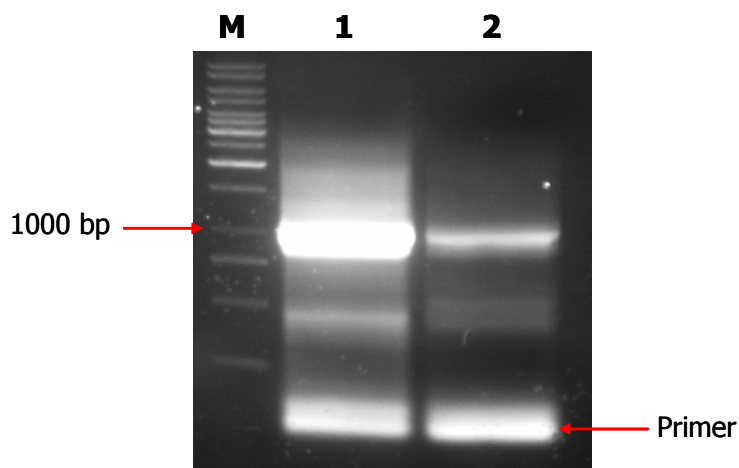


**Abb. 2-45: Genomische und cDNA Struktur von *hmARC1* und *hmARC2*.** A: Tandemorientierung von *hmARC1* (Nucleotide Accession: NM\_022746) und *hmARC2* (Nucleotide Accession: NM\_017898) auf Chromosom 1. B: Exon-Intron-Struktur von *hmARC1* und *hmARC2*. Dargestellt sind die open reading frames (orf) mit den entsprechenden Exons (Boxen) und den sie trennenden Introns (Peaks). Die Größen sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

### 2.3.7 cDNA-Isolierung von *hmARC1* und *hmARC2*

Als DNA-template für die Amplifikation der cDNAs von *hmARC1* und *hmARC2* wurde die zunächst revers transkribierte mRNA aus HepG2-Zellen, einer humanen Leberzelllinie (Human hepatocellular liver carcinoma cell line) verwendet. Es wurden Primer erzeugt, die zu den bekannten Start- und Stopp-Sequenzen der humanen *mARC*-Gene komplementär sind. Außerdem wurden die Primer mit Schnittstellen für eine gerichtete *Bam*HI/*Hind*III-Klonierung versehen. Zunächst wurde versucht, die entsprechenden Full-Length-cDNAs der humanen

mARC-Proteine zu erhalten. Da keinerlei Vorkenntnisse über die optimalen Annealingtemperaturen für die Primer vorlagen, wurden verschiedene Annealingtemperaturen von 52–69 °C getestet. Außerdem wurden unterschiedliche DNA-Polymerasen unter Verwendung verschiedener Zusätze wie  $MgCl_2$ ,  $MgSO_4$ , DMSO und Enhancer sowie variierende dNTP-Konzentrationen in Test-PCRs verwendet. Es gelang jedoch auch nach Nutzung von nested-PCR nicht, die gewünschten cDNAs in voller Länge zu amplifizieren. Schließlich wurde versucht, überlappende Teilfragmente der cDNA zu amplifizieren, die anschließend mit Hilfe von Fusions-PCR zur Gesamt-cDNA fusioniert werden sollten. Den PCR-Ansätzen wurden dabei 4 % DMSO und Enhancer zugesetzt. Die Teilfragmente wurden mit einer Taq-DNA-Polymerase amplifiziert, die nachfolgende Fusions-PCR erfolgte mit einem Taq:Pwo-Gemisch von 1:6. Auf diese Weise konnten vollständige cDNAs mit einer Größe von etwa 1000 bp von beiden Proteinen erhalten werden (Abb. 2-46).



**Abb. 2-46: Ergebnis der Fusions-PCR zur Amplifizierung der cDNAs von *hmARC1* und *hmARC2*.** Es wurden jeweils die gesamten PCR-Ansätze von *hmARC1* (Spur 1) und *hmARC2* (Spur 2) auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetragen. Die DNA der Bande bei ca. 1000 bp wurde in beiden Fällen eluiert und kloniert. Die unteren Banden resultieren aus überschüssigem Primer. (M = molekularer Marker)

Die durch Fusions-PCR erhaltene cDNA wurde in den Vektor pGEM-T Easy kloniert und positive Klone nachfolgend sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, dass es sich bei beiden Homologen um die gewünschten cDNAs handelte, diese jedoch mit Mutationen behaftet waren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte von *hmARC1* bisher ein positiver Klon sequenziert werden, dessen cDNA zwei Mutationen trug. Diese Mutationen führen auf Aminosäure-Ebene zum Austausch des Arginin 107 gegen ein Histidin und des Lysin 187 gegen ein Methionin. Von *hmARC2* wurden mehrfach zwei verschiedene Sequenzen in unabhängigen Klonen erhalten. Fünfmal wurde eine Sequenz erhalten, die sowohl eine Deletion an Position 198 als auch ein zusätzliches Stopp-Codon an Position 105 bewirkt. Bei einer anderen, bisher zweimal

erhaltenen Sequenz, ist auf Aminosäureebene das Arginin 49 gegen ein Tryptophan und das Cystein 160 gegen ein Tyrosin ausgetauscht. Es wurden sowohl Klone sequenziert, die ausschließlich diese Mutationen bzw. Deletion und Stopp-Codon enthielten, als auch solche, die weitere Mutationen aufwiesen. Da alle sequenzierten Klone von *hmARC2* die aufgeführten Mutationen konstant zeigten, muss davon ausgegangen werden, dass diese Art der Mutation bereits heterozygot im Template der verwendeten HepG2-Zellen auftritt. Aufgrund der Reproduzierbarkeit der zu den beiden Aminosäureaustauschen führenden Mutationen in der Sequenz von *hmARC2*, wurde die cDNA über die *Bam*HI- und *Hind*III-Schnittstellen gerichtet in den Expressionsvektor pQE80 kloniert, um *hmARC2* rekombinant zu exprimieren.

### **2.3.8 Expression von *hmARC2***

Das durch die Klonierung entstandene Expressionskonstrukt pQE80/*hmARC2* codiert für ein 6xHis-getaggtetes Protein, wodurch die affinitätschromatographische Aufreinigung des exprimierten Proteins ermöglicht wird. Das Protein wurde im *E. coli*-Expressionsstamm TP1000 exprimiert, da dieser den Moco in der eukaryotischen Form und in hohen Mengen akkumuliert.

#### **2.3.8.1 Expressionskinetik zur Expression von *hmARC2***

Um Bedingungen zu finden unter denen *hmARC2* möglichst optimal exprimiert wird, wurde eine Expressionskinetik durchgeführt. Zunächst war das Ziel möglichst große Mengen des Proteins in nativer Form zu erhalten. Verschiedene Parameter wurden variiert und getestet. Die Expression wurde bei drei verschiedenen Inkubationstemperaturen durchgeführt, und zwar bei 22 °C, 30 °C und 37 °C. Die Induktion der Expression erfolgte zu unterschiedlichen Wachstumsphasen ( $OD_{600} = 0,1, 0,5, \text{ und } 1,0$ ) und wurde durch zwei verschiedene IPTG-Konzentrationen von final 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  gestartet. Die Biosynthese des Moco wurde hierbei durch die Zugabe von 1 mM Na-Molybdat unterstützt. Um Informationen über die geeignete Expressionsdauer zu erhalten, wurden Aliquots der Expressionskultur jeweils nach 4 h, 8 h, 12 h und 20 h pelletiert und aufgeschossen. Die Expressionen wurden in 50 ml-Kulturen durchgeführt, von denen pro Testansatz 4 ml entnommen wurden.

### **2.3.8.2 Western-Analyse der Expressionskinetik von hmARC2**

Die aus der Expressionskinetik erhaltenen Proteinextrakte wurden einer Western-Analyse unterzogen, indem zunächst 40 µl jedes Testansatzes über ein 12%iges SDS-Gel aufgetrennt und anschließend geblottet wurden. Zur Immunodetektion der geblotteten Proteine wurde ein monoklonaler primärer Antikörper aus der Maus verwendet, der gegen den His-Tag gerichtet war. Der polyklonale sekundäre Anti-Maus-IgG war mit alkalischer Phosphatase gekoppelt.

Es konnten in allen Expressionsansätzen bei 22 °C und 37 °C Proteine der interessierenden Größe über die Immunodetektion nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Diese Inkubationstemperaturen scheinen grundsätzlich für die rekombinante Überexpression von hmARC2 geeignet zu sein. Allerdings konnten in den Ansätzen nach Expression bei 37 °C weitaus mehr unspezifische Banden nachgewiesen werden als bei 22 °C. Zusätzlich zeigte sich, dass höhere IPTG-Konzentrationen bei langen Expressionszeiten keinen weiteren Vorteil bringen, bei kurzen Expressionszeiten jedoch stärkere Banden und somit größere Proteinmengen zu verzeichnen sind. Je fortgeschrittener die Wachstumsphase bei der Induktion ist und je länger die Expressionsdauer, desto mehr Protein konnte in der Western-Analyse nachgewiesen werden.

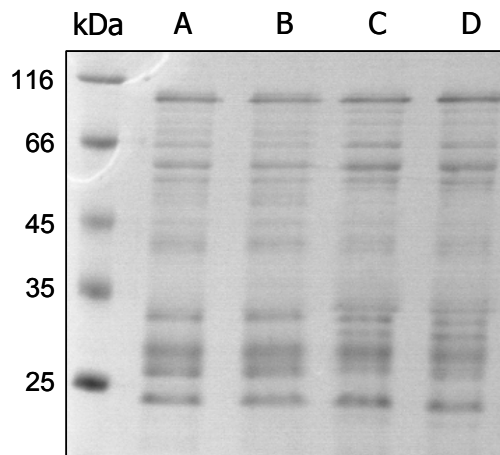
### **2.3.8.3 Expression von hmARC2 in größerem Maßstab**

Da die Western-Analyse der Expressionskinetik nur begrenzte Rückschlüsse auf optimale Expressionsbedingungen für hmARC2 zuließ, wurden vier aussichtsreiche Bedingungen in größerem Maßstab getestet, um weitere Informationen zu erhalten. Die Expressionen wurden bei 22 °C und 37 °C durchgeführt und die Induktion wurde bei einer  $OD_{600} = 0,1$  und bei einer  $OD_{600} = 0,5$  mit 10 µM IPTG gestartet. Zusätzlich wurde die Moco-Biosynthese durch Zugabe von 1 mM Molybdat unterstützt. Die Zellernte erfolgte bei allen Ansätzen nach 20 h. Diese Expressionsbedingungen orientierten sich in IPTG-Konzentration und Expressionsdauer neben den Erkenntnissen aus der Kinetik auch an den bekannten optimalen Bedingungen für die Expression von HMCS-CT und ABA3-CT.

Die nach Zellaufschluss erhaltenen Rohextrakte wurden über Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Matrix aufgereinigt. Die Elution der Proteine konnte anhand der bräunlichen Färbung verfolgt werden, was ein erster Hinweis auf eine mögliche Bindung von Moco bzw. MPT am Protein war. Hierbei zeigten die bei 22 °C exprimierten Proteine eine intensivere Braunfärbung als die zwei Expressionen bei 37 °C. Ähnlich wie bei ABA3-CT scheint auch hier

die Moco-Biosynthese bei niedrigeren Expressionstemperaturen besser mit Zellwachstum und Proteinbiosynthese Schritt halten zu können.

Je 10 µg der eluierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie angefärbt (Abb. 2-47). Alle Expressionen zeigten ein ähnliches unbefriedigendes Ergebnis. hmARC2 konnte unter den gewählten Bedingungen nicht in reiner Form erhalten werden, es wurde eine Vielzahl anderer Proteine mit aufgereinigt. Auch zeigte sich keine dominante Bande im gewünschten Größenbereich.

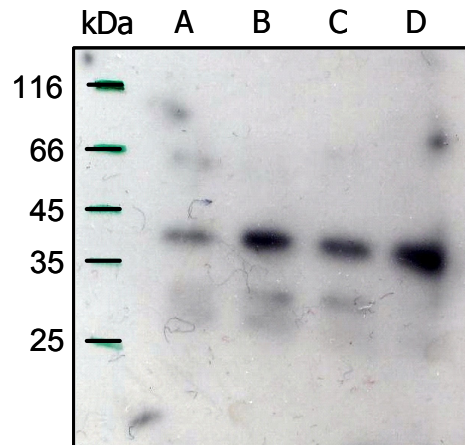


**Abb. 2-47:** Affinitätschromatographisch aufgereinigtes hmARC2 nach unterschiedlichen Expressionsbedingungen. Je 10 µg der Elutionsfraktionen nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden auf ein 12%iges SDS-PA-Gel aufgetragen und mittels Coomassie-Blue gefärbt. A: 22 °C und OD<sub>600</sub> bei Induktion = 0,1; B: 22 °C und OD<sub>600</sub> bei Induktion = 0,5; C: 37 °C und OD<sub>600</sub> bei Induktion = 0,1; D: 37 °C und OD<sub>600</sub> bei Induktion = 0,5. Alle Expressionen wurden durch 10 µM IPTG induziert und hatten eine Dauer von 20 h.

#### 2.3.8.4 Western-Analyse von hmARC2

Um zu kontrollieren, ob trotz der starken Verunreinigungen nach Ni-NTA-Aufreinigung überhaupt eine Expression des gewünschten hmARC2 erfolgte, wurde ein Western-Blot mit Aliquots der erhaltenen Proteineluate der in 2.3.8.3 aufgeführten vier Expressionen durchgeführt. Die Immunodetektion erfolgte mittels gegen ABA3-CT gerichteten polyklonalen Antikörper aus Kaninchen, als Sekundär-Antikörper diente Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG. Bei allen vier Expressionen konnte eine Bande mit einer Größe von etwa 38 kDa detektiert werden (Abb. 2-48), was der errechneten Größe von hmARC2 mit His-Tag entspricht. Diese Bande war in den Ansätzen, in denen zu einer späteren Wachstumsphase induziert wurde (OD<sub>600</sub> = 0,5) stärker ausgeprägt als bei den Expressionen, bei denen die Induktion zu einer früheren Wachstumsphase stattfand (OD<sub>600</sub> = 0,1). Dies war sowohl bei einer Expressionstemperatur von 22 °C als auch bei 37 °C zu

beobachten. Weitere Expressionsansätze mit ähnlichen Parametern wurden durchgeführt, jedoch konnte keine bessere Aufreinigung bzw. stärkere Expression von hmARC2 unter diesen Bedingungen erreicht werden.



**Abb. 2-48: Western-Analyse der Expressionsansätze von hmARC2.** Es wurden jeweils 20 µg Ni-NTA-gereinigte Protein verwendet. Zur Detektion wurde der Anti-ABA3-CT Antikörper eingesetzt, der durch HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper nachgewiesen wurde. A: 22 °C und OD<sub>600</sub> bei Induktion = 0,1; B: 22 °C und OD<sub>600</sub> = 0,5; C: 37 °C und OD<sub>600</sub> = 0,1; D: 37 °C und OD<sub>600</sub> = 0,5. Alle Expressionen wurden durch 10 µM IPTG induziert und hatten eine Dauer von 20 h.

#### 2.3.8.5 Nachweis von Cofaktorbindung an hmARC2

Obwohl das Protein hmARC2 in keiner der vier gewählten Expressionsansätze in ausreichend reiner Form erhalten werden konnte, sollte es mit allen Vorbehalten auf das Vorhandensein des Moco getestet werden. Es sollte geklärt werden, ob die Proteineluate grundsätzlich das hmARC2 enthalten, welches Cofaktor gebunden hat. Hierzu wurde der Moco/MPT-Gehalt der Eluate über die FormA-Analyse und im *nit-1*-Assay unter Zugabe von Molybdat untersucht. Zusätzlich wurde im *nit-1*-Assay ohne Molybdat-Zugabe geprüft, ob auch aktiver Moco in den Proteineluaten vorliegt.

#### 2.3.8.6 FormA-Analyse

Zum Nachweis von FormA wurden jeweils 5 µl des Ni-NTA-gereinigten Proteins eingesetzt. Nach Umwandlung zu FormA-dephospho und Aufreinigung über isokratische Anionen-Austauscherchromatographie wurden 200 µl der Eluate für den FormA-Nachweis durch HPLC verwendet. Bei den Proteinen aller vier Expressionsbedingungen traten FormA-Peaks



vergleichbarer Größe auf, die jedoch durch weitere unspezifische Peaks begleitet wurden (ohne Abbildung). Da hmARC2 in den genutzten Proteineluaten nur einen geringen Teil der Gesamtproteinmenge ausmacht, kann keine Aussage über die FormA-Menge pro Protein gemacht werden. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass das detektierte FormA-dephospho zumindest teilweise von hmARC2 stammt, da unspezifisch über die Ni-NTA-Matrix aufgereinigte Proteine üblicherweise nicht soviel MPT/Moco aufweisen.

#### **2.3.8.7 Biologischer Nachweis von Moco/MPT durch den *nit-1*-NADPH-NR Rekonstitutions-Assay**

Von allen vier Expressionen wurden im Rahmen des *nit-1*-Assays Komplementationsversuche der NADPH NR-Aktivität sowohl mit als auch ohne Zugabe von Molybdat gemacht. Über die Abhängigkeit der NR-Aktivität von der Molybdatzugabe sollten Rückschlüsse gezogen werden, ob MPT oder Moco gebunden an hmARC vorliegt. Für den Assay wurden in dreifacher Bestimmung je 1 µg der Ni-NTA-gereinigten Proteine aller Expressionen eingesetzt. Die Ansätze wurden zur Freisetzung des Cofaktors hitzedenaturiert, abgekühlt und mit 20 µl *nit-1*-Extrakt versetzt, welcher final 4 mM GSH und, wo erforderlich, final 10 mM Na-Molybdat enthielt. Die Rekonstitution erfolgte anaerob für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Der Nachweis der rekonstituierten NADPH NR-Aktivität wurde wie unter 4.4.16 beschrieben, durchgeführt.

Die Proteineluate aller vier Expressionen waren unabhängig von der Molybdatzugabe in der Lage, die NR-Aktivität zu rekonstituieren (Tab. 2-9). Dabei lagen die Absorptionswerte bei den Ansätzen mit Molybdat durchgängig im linearen Bereich und ohne Molybdat unterhalb des linearen Wertebereichs. Die erhaltenen Absorptionen waren bei den verschiedenen Expressionen vergleichbar, allerdings insgesamt recht gering. Auch hier konnte aufgrund der unrein vorliegenden Proteine nicht sichergestellt werden, dass die Rekonstitutionsfähigkeit ausschließlich von hmARC2 herrührt, so dass keine Quantifizierung in Form einer spezifischen Aktivität erfolgte.

**Tab. 2-9: *nit-1*-Assay verschiedener Expressionsansätze von hmARC2.** Dargestellt sind die gemittelten Absorptionswerte des *nit-1*-Assays der vier Expressionsbedingungen von rekombinant exprimiertem hmARC2. Alle Expressionen wurden durch 10  $\mu$ M IPTG induziert und hatten eine Dauer von 20 h.

Expressionsbedingungen	mit Molybdat	ohne Molybdat
22 °C und OD <sub>600</sub> = 0,1	0,134	0,025
22 °C und OD <sub>600</sub> = 0,5	0,150	0,033
37 °C und OD <sub>600</sub> = 0,1	0,185	0,07
37 °C und OD <sub>600</sub> = 0,5	0,141	0

### 2.3.9 Bestimmung der Benzamidoxim-Reduktaseaktivität von ABA3-CT

Die Benzamidoxim-Reduktaseaktivität für HMCS-CT konnte durch den Nachweis von gebildetem Benzamidin über HPLC-Analytik in Kiel nachgewiesen werden. Da es nicht möglich war, die entsprechende HPLC-Analytik während dieser Arbeit in Braunschweig durchzuführen, sollte die Möglichkeit getestet werden, die Benzamidoxim-Reduktaseaktivität, über den Umsatz des Cosubstrates NADH zu ermitteln.

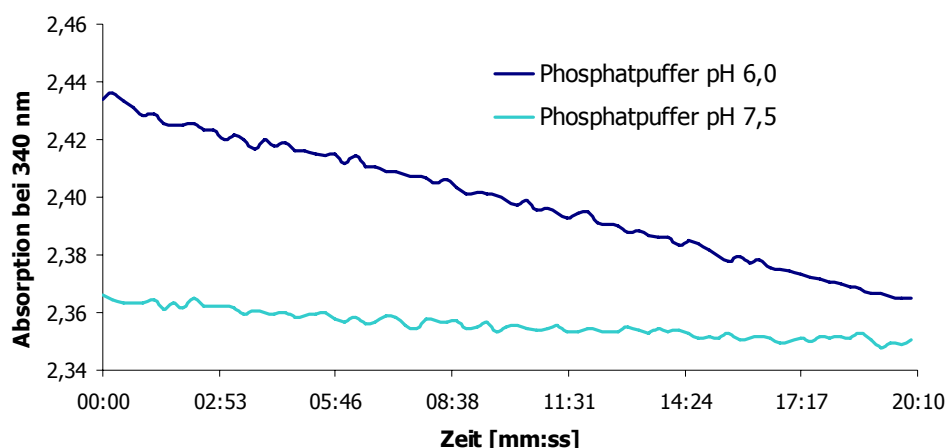
#### 2.3.9.1 Erstellung der NADH-Kalibriergeraden

NADH zeigt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm und kann darüber photometrisch quantifiziert werden. Eine NADH-Kalibriergerade wurde mit 14 Ansätzen im Mengenbereich von 0 - 0,7  $\mu$ mol NADH in dreifacher Bestimmung erstellt und bei 340 nm vermessen (siehe Anhang). Die Kalibriergerade war im Bereich von 0,1 – 0,4  $\mu$ mol NADH linear. Aus den ermittelten Absorptionswerten ergab sich eine Regressionsgerade mit der Formel  $y = 4,8371x + 0,1517$ , über die nach Umstellen die NADH-Menge zu Beginn und am Ende der Reaktion bestimmt werden konnte.

#### 2.3.9.2 Bestimmung der NADH-Zerfallsrate

In einem Vorversuch wurde ein möglicher spontaner Abbau des NADH zu NAD<sup>+</sup> bei RT untersucht. Da die Umsetzung von Benzamidoxim zu Benzamidin durch HMCS-CT in Kiel in

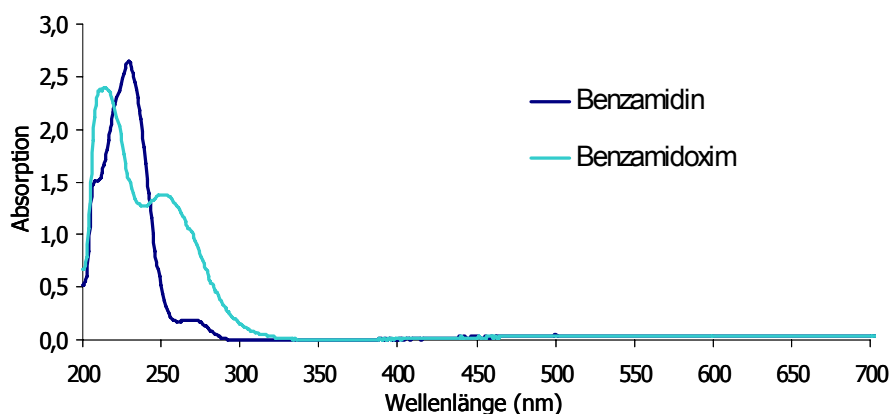
0,1 M Phosphatpuffer erfolgte, wurde NADH in Phosphatpuffern unterschiedlichen pH-Wertes gelöst und die Absorptionsveränderung bei 340 nm über 20 min verfolgt. Es zeigte sich, dass NADH bei RT relativ instabil ist und zerfällt. Dabei kam es allerdings zu einem stärkeren Zerfall im leicht sauren Bereich (0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0) als im neutralen Bereich (Abb. 2-49). Unter den gewählten Bedingungen beträgt der Zerfall bei pH 6,0 71 pmol NADH/min und bei pH 7,5 15,5 pmol NADH/min. Um diesen Zerfall des NADH möglichst gering zu halten, wurden alle nachfolgenden Versuche im Phosphatpuffer pH 7,0 durchgeführt. Zusätzlich wurde NADH auch in der Referenz eingesetzt, um den ermittelten Zerfallsfaktor direkt in den Assay mit einbeziehen zu können.



**Abb. 2-49: pH-abhängiger Zerfall von NADH bei RT.** 0,4 mM NADH wurden in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer eingesetzt und bei 340 nm für 20 min vermessen.

### 2.3.9.3 Spektrometrische Vermessung von Benzamidoxim und Benzamidin

Um die *N*-reduktive Aktivität anhand des Abbaus von NADH zu bestimmen, das bei 340 nm absorbiert, musste eine mögliche Absorption des Substrates Benzamidoxims und seiner *N*-reduzierten Form Benzamidin bei dieser Wellenlänge ausgeschlossen werden. Beide Substanzen wurden in einer Konzentration von 0,2 mM in Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 spektrometrisch vermessen (Abb. 2-50). Weder Benzamidoxim noch Benzamidin zeigten eine Absorption bei 340 nm, so dass ein Einfluss beider Substanzen auf den Assay ausgeschlossen werden konnte.



**Abb. 2-50: Absorptionsspektren von Benzamidin und Benzamidoxim.** Es wurden je 0,2 mM Benzamidin bzw. Benzamidoxim in Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 eingesetzt und über einen Wellenlängenbereich von 200 – 700 nm vermessen.

#### 2.3.9.4 *N*-reduktive Aktivität von ABA3-CT

Um eine starke Präzipitation von ABA3-CT auszuschließen, wurden alle Versuche bei RT, statt wie in Kiel bei 37 °C durchgeführt. Da der Umsatz des Benzamidoxims unter den gewählten Bedingungen mit den in Kiel genutzten ABA3-CT-Mengen von 135 µg bzw. 270 µg nur sehr langsam verlief (ohne Abbildung), erfolgte die Ermittlung der Benzamidoxim-reduktaseaktivität mit jeweils 500 µg (13,8 nmol) in TP1000 rekombinant exprimiertem ABA3-CT. Der Inkubationsansatz enthielt 0,2 mM Benzamidoxim und 0,4 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0. Die Reaktion wurde aerob über 20 min durchgeführt. Zunächst wurden ABA3-C-Termini aus drei verschiedenen Expressionsansätzen verwendet. Dabei zeigten sich große Unterschiede bei den NADH-Umsatzraten (Tab. 2-10). Da die Reduktion des Benzamidoxims nur durch die Moco-beladene Form des C-Terminus möglich ist (Tab. 2-7), wurden unterschiedliche Cofaktorbeladungen der verwendeten C-Termini angenommen. Eine Steigerung der *N*-reduktiven Aktivität aufgrund höherer FormA-Werte konnte hier allerdings nicht beobachtet werden, es zeigte sich keine direkte Korrelation zwischen FormA-Menge und *N*-reduktiver Aktivität. Da die FormA-Menge jedoch nur einen Rückschluss auf die Gesamtcofaktormenge (Moco und MPT) zulässt, konnte keine Aussage über die Beladung mit Moco sowie über dessen Sulfurierungsstatus gemacht werden. Grundsätzlich sind etwa 60 % des an ABA3-CT gebundenen Cofaktors auf den Moco zurückzuführen (siehe Tab. 2-1), jedoch variiert dieser Anteil zwischen ABA3-CT-Chargen, woraus möglicherweise die unterschiedlichen NADH-Umsatzraten resultieren.

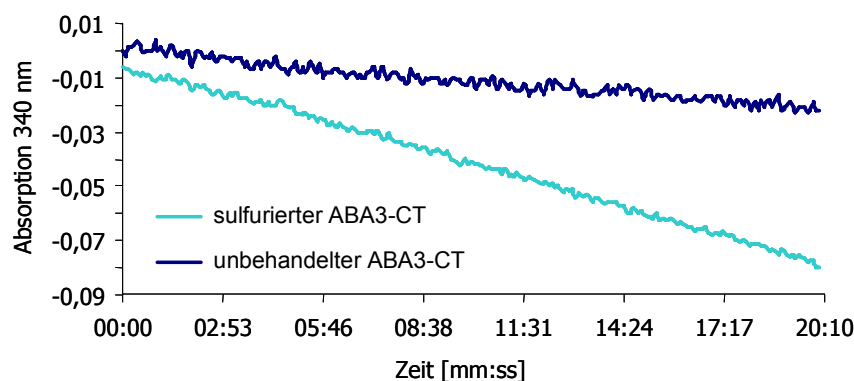
**Tab. 2-10: NADH-Umsatzraten und FormA-Mengen verschiedener ABA3-CT-Chargen.**  
FE = Flächeneinheiten FormA; zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung fehlte ein verlässlicher FormA-Standard, so dass die FormA-Menge in relativen FE angegeben wird.

Charge	Reduktaseaktivität [nmol NADH / (mg*min)]	FormA [FE / nmol Protein]
ABA3-CT 1	3,184	178781
ABA3-CT 2	1,154	92779
ABA3-CT 3	4,45	59515

### 2.3.9.5 Benzamidoximreduktion durch chemisch sulfurierten ABA3-CT

Über die Art des an mARC gebundenen Cofaktors ist bisher noch nichts bekannt. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass mARC Moco bindet (Tab. 2-9), jedoch kann keine Aussage über die Liganden des Molybdäns gemacht werden. Insbesondere ist unklar, ob der Cofaktor wie bei den in dieser Arbeit untersuchten Moco-Sulfurase-C-Termini und den Enzymen der XO-Familie einen terminalen Schwefel aufweist und ob dieser möglicherweise für die *N*-reduktive Aktivität essentiell ist. Ein möglicher Einfluss des terminalen Schwefels auf die *N*-reduktive Aktivität sollte zunächst an ABA3-CT untersucht werden. Hierzu wurden 500 µg ABA3-CT chemisch sulfuriert. Die Sulfurierung erfolgte anaerob mit Natriumdithionit und Natriumsulfid. Eine unbehandelte Kontrolle desselben ABA3-CT wurde unter gleichen Bedingungen mitgeführt. Beide Ansätze wurden in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer umgepuffert und die Benzamidoximreduktaseaktivität wie unter 2.3.9.4 beschrieben, ermittelt. Ebenso wurde die Menge an gebundenem Cofaktor über FormA nachgewiesen.

Die chemische Sulfurierung scheint einen leicht positiven Einfluss auf die *N*-reduktive Aktivität von ABA3-CT zu haben (Abb. 2-51). Der sulfurierte ABA3-CT zeigt einen NADH-Umsatz von 9,6 nmol NADH/(min\*mg) im Vergleich zu einem Umsatz von 8,01 nmol NADH/(min\*mg) bei der unbehandelten Kontrolle. Die Beladung mit Moco/MPT beträgt hierbei in der Kontrolle 93092 FE/nmol und damit 98,3 % im Verhältnis zum sulfurierten Ansatz (94731 FE/nmol). Die leicht erhöhte *N*-reduktive Aktivität des sulfurierten ABA3-CT bei nahezu gleicher Menge an gebundenem Cofaktor deutet einen Einfluss des Sulfurierungsstatus auf die *N*-reduktive Aktivität an.

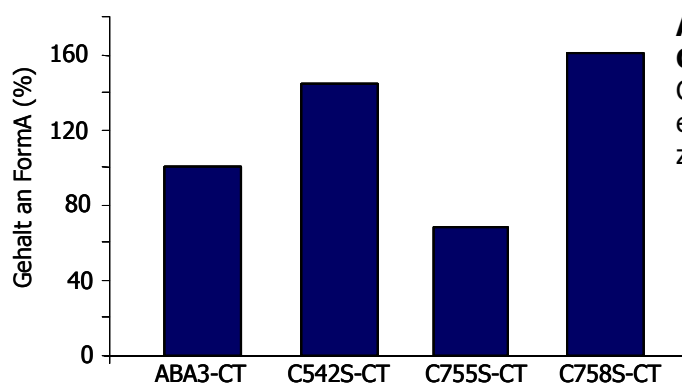


**Abb. 2-51:** *N*-reduktive Aktivität von chemisch sulfuriertem und unbehandeltem ABA3-CT. NADH-Verbrauch von jeweils 500 µg sulfuriertem und unbehandeltem ABA3-CT in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit 0,4 mM NADH und 0,2 mM Benzamidoxim über 20 min gemessen.

### 2.3.9.6 Benzamidoximreduktaseaktivität der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT

ABA3-CT weist in der Aminosäuresequenz insgesamt neun Cysteinreste auf, von denen drei Cysteine unter allen bisher bekannten Moco-Sulfurase-C-Termini und auch unter den pflanzlichen und humanen mARCs strikt konserviert sind (im ABA3-CT: C542, C755 und C758; siehe Abb. 2-17). Diese konservierten Cysteine wurden in ABA3-CT einzeln gegen ein Serin ausgetauscht. Die Charakterisierung dieser Varianten wurde unter 2.1.15 beschrieben. Die Varianten sollten im Hinblick auf ihre *N*-reduktive Aktivität untersucht werden, wobei zunächst von allen Varianten und einer Wildtyp-Kontrolle jeweils 500 µg Protein unter den in 2.3.9.4 beschriebenen Bedingungen getestet wurde. Die zugehörigen FormA-Werte wurden ermittelt und anschließend alle Proteine nochmals auf Basis gleicher FormA-Mengen vermessen. Es zeigte sich, dass grundsätzlich alle Varianten in der Lage waren, unter Abbau des Cosubstrates NADH Benzamidoxim zu Benzamidin umzusetzen. Allerdings variierte die Umsatzrate hierbei erheblich. Auf Basis gleicher Proteinmengen zeigte C542S-CT die höchste Aktivität mit 16,3 nmol NADH/(min\*mg). C755S-CT lieferte einen Umsatz von 7,59 nmol/(min\*mg) und die geringste Aktivität wies die C758S-CT-Variante mit 3,37 nmol/(min\*mg) auf (Tab. 2-11). Die Anpassung der Proteinmengen auf gleiche FormA-Mengen erfolgte anhand der prozentualen Verhältnisse der FormA-Gehalte (Abb. 2-52). In Bezug auf den Wildtyp betrugen die Verhältnisse für die Variante C542S-CT = 143 %, für die Variante C755S-CT = 68 % und für die Variante C758S-CT = 161 %. Diese ermittelten FormA-Mengen entsprechen den üblicherweise für diese ABA3-CT-Varianten erhaltenen Mengen. Vom Wildtyp-Protein wurden wieder 500 µg eingesetzt, die anderen Proteinmengen wurden entsprechend der Cofaktorbeladung angepasst. Auch hier weist C542S-CT die

höchste Aktivität auf, sowohl die beiden anderen Varianten als auch das verwendete Wildtyp-Protein zeigten eine deutlich geringere Umsatzrate.



**Abb. 2-52: FormA-Gehalte der ABA3-CT-Varianten.** Gezeigt sind die FormA-Gehalte der im Benzaminoximreduktase-Assay eingesetzten ABA3-CT-Varianten im Vergleich zum Wildtyp-Protein.

C542S-CT ist durch eine hohe Cofaktorbeladung und hohe Mengen an terminalem Schwefel charakterisiert. Von den eingesetzten Varianten zeigt C758S-CT, der durch hohe Cofaktormengen bei fehlendem terminalen Schwefel gekennzeichnet ist, die geringste Aktivität. Alle eingefügten Mutationen scheinen hier jedoch zur Begünstigung der *N*-reduktiven Aktivität beitragen, da das verwendete Wildtyp-Protein die geringste Aktivität zeigt. Ein Vergleich mit anderen zuvor verwendeten ABA3-CT zeigt jedoch die bereits unter 2.3.9.4 beschriebene Varianz in der *N*-reduktiven Aktivität unter den verschiedenen Wildtyp-Chargen.

**Tab. 2-11: *N*-reduktive Aktivität der ABA3-CT-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT.** Die Proteine der eingefärbten Zeilen wurden im gleichen Versuchsansatz eingesetzt, die anderen ABA3-CT zeigen die grundsätzliche Varianz der *N*-reduktiven Aktivität des Wildtyp-Proteins. Für die Ansätze mit gleicher Proteinmenge wurden jeweils 500 µg eingesetzt; für die Ansätze mit gleichen FormA-Mengen wurden 500 µg für ABA3-CT 2, 350 µg für C542S-CT, 735 µg für C755S-CT und 311 µg für C758S-CT eingesetzt.

	Reduktaseaktivität [nmol NADH/(min*mg)] gleiche Proteinmenge	Reduktaseaktivität [nmol NADH/min] gleiche FormA Menge
ABA3-CT 1	3,18	0,23
ABA3-CT 2	1,15	0,58
ABA3-CT 3	4,45	6,04
ABA3-CT 4	8,01	7,98
ABA3-CT / C542S	16,3	8,45
ABA3-CT / C755S	7,59	1,32
ABA3-CT / C758S	3,37	0,72

## 3 Diskussion

### 3.1 Die Moco-Sulfurase ABA3 aus *A. thaliana*

Der *aba3*-Locus wurde 1996 erstmals durch Léon-Kloosterziel *et al.* beschrieben nachdem sie ABA-defiziente *A. thaliana*-Pflanzen biochemisch charakterisiert hatten. Dem Genprodukt dieses neu entdeckten Locus konnte zunächst zwar keine Funktion zugeordnet werden, doch dies änderte sich durch eine grundlegende Charakterisierung der *aba3*-Mutante durch Schwartz *et al.* (1997), bei der eine Beteiligung von ABA3 an der Sulfurierung des Moco von AO und XDH nachgewiesen wurde. Das *aba3*-Gen konnte schließlich 2001 durch Bittner und Mitarbeiter kloniert und rekombinant exprimiert werden, so dass eine erste biochemische Charakterisierung des rekombinant exprimierten ABA3-Proteins erfolgen konnte. Es zeigte sich, dass ABA3 über eine L-Cystein-Desulfurase-Aktivität verfügte, die durch die Umwandlung von zugesetztem L-Cystein zu L-Alanin nachgewiesen werden konnte. Insbesondere konnte die für ABA3 postulierte Funktion bei der Moco-Sulfurierung durch *in vitro*-Experimente bestätigt werden. Ein Vergleich der ABA3-Aminosäuresequenz mit den Sequenzen anderer bekannter Moco-Sulfurasen zeigte deutliche Homologien unter allen Moco-Sulfurasen, wobei die stärksten Homologien im NH<sub>2</sub>-terminalen Bereich und im C-terminalen Bereich der Proteine auftraten. Zwischen diesen beiden homologen Sequenzabschnitten befanden sich nur sehr schwach konservierte Bereiche. Die auf die beiden terminalen Bereiche der Moco-Sulfurasen beschränkte Homologie sprach für eine Unterteilung des Full-Length-Proteins in zwei Domänen, die durch eine Linker-Region miteinander verbunden werden. Bereits zuvor hatten Komplementationsversuche, die mit heteroallelen *ma-1* (Glassman und Pinkerton, 1960; Chovnick *et al.*, 1969) und *hxB*-Mutanten (Hartley, 1970) aus *D. melanogaster* bzw. *E. nidulans* durchgeführt wurden, eine intragenische Komplementation gezeigt, woraufhin 2000 von Amrani und Mitarbeitern postuliert wurde, dass es sich bei den Moco-Sulfurasen um Proteine mit mindestens zwei funktionellen Domänen handelt. Die NH<sub>2</sub>-terminale Domäne von ABA3 zeigt außerdem signifikante Homologien zu Aminotransferasen der Klasse V und insbesondere zu NifS- und NifS-ähnlichen Proteinen wie es auch schon für Ma-I beschrieben wurde (Amrani *et al.*, 2000). Bei NifS-ähnlichen Proteinen handelt es sich um L-Cystein-Desulfurasen, die in einer PLP-abhängigen Reaktion die Umwandlung von L-Cystein zu L-Alanin katalysieren und den dabei freigesetzten Schwefel in Form eines Persulfides binden. Diese Enzyme erfüllen ihre Hauptaufgaben als Schwefellieferanten bei der Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern (Mihara und Esaki, 2002), aber auch bei der  $\alpha$ -Liponsäuresynthese (Ollagnier-de-Choudens *et al.*,



2000; Miller *et al.*, 2000; Cicchillo *et al.*, 2004; Cicchillo und Booker, 2005), bei der Thiamin-Synthese (Begley *et al.*, 1999), oder bei der Thiolierung von tRNA (Lauhon und Kambampati, 2000; Lauhon, 2002). Gemein ist den NifS-ähnlichen Enzymen neben einem strikt konservierten Cysteinrest zur Bindung des Persulfids (Zheng *et al.*, 1993) auch ein ebenfalls strikt konservierter Lysinrest, an den der PLP-Cofaktor bindet. Heidenreich *et al.* konnten 2005 zeigen, dass die separat exprimierte NH<sub>2</sub>-terminale NifS-ähnliche Domäne von ABA3 (ABA3-NifS) ebenfalls alle diese Eigenschaften aufweist. So bindet ein PLP-Cofaktor an das konservierte Lysin 271, und die Bildung eines Persulfides, das an das Cystein 430 bindet, konnte nachgewiesen werden. ABA3-Varianten mit Austausch einer dieser beiden Aminosäuren führten zu drastischem bzw. totalem Ausfall der L-Cystein-Desulfurase-Aktivitäten. Eine weitere Eigenschaft, die für NifS-ähnliche Proteine bekannt ist, ist eine Selenocystein-Lyase-Aktivität mit bisher ungeklärter physiologischer Relevanz (Mihara *et al.*, 1999; 2000), die ebenfalls an ABA3 nachgewiesen werden konnte. Ein Vergleich mit bekannten NifS-ähnlichen Proteinen führte schließlich zur Einteilung von ABA3-NifS zum Typ II dieser Enzyme, zu dem die SufS-Enzyme (Mihara *et al.*, 1997) zählen. Da sich die Homologien zu den NifS-ähnlichen Enzymen ausschließlich auf das NH<sub>2</sub>-terminale ABA3-NifS beschränken und für das separat exprimierte ABA3-NifS sowohl die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität als auch *in vitro* die Moco-Sulfurase-Aktivität gezeigt werden konnte (Heidenreich *et al.*, 2005), wurde neben der strukturellen auch eine funktionelle Trennung von ABA3 in zwei verschiedene Domänen angenommen. Im Gegensatz zu ABA3-NifS konnte die C-terminale Domäne von ABA3 zu Beginn dieser Arbeit keiner anderen Gen- oder Proteinfamilie zugeordnet werden, die Rückschlüsse auf die Funktion dieser Domäne zugelassen hätten. Hieraus ergab sich die Frage nach der Bedeutung der C-terminalen Domäne für die Moco-Sulfurierung. So wurde eine Rolle des C-Terminus bei der Erkennung der Zielproteine AO und XDH angenommen (Amrani *et al.*, 2000; Bittner *et al.*, 2001). Einen ersten Nachweis der Bedeutung der C-terminalen Domäne für die Aktivierung von AO und XDH zeigten Sagi und Mitarbeiter 2002 durch die Charakterisierung der *flacca*-Mutante in Tomaten, die den für Moco-Sulfurase-Mutanten üblichen welken Phänotyp aufweist und durch einen Aktivitätsverlust von AO und XDH im Spross und der Reduktion dieser Aktivitäten in den Wurzeln gekennzeichnet ist. Der Mutation liegt die Deletion zweier benachbarter Arginine im C-Terminus von Flacca sowie der Austausch eines benachbarten Alanins durch ein Threonin zugrunde. Diese Mutation zeigte als erste von weiteren, dass den Moco-Sulfurase-C-Termini *in vivo* eine essentielle Rolle bei der Aktivierung der Monooxo-Hydroxylasen zukommt. Um die Eigenschaften von ABA3-CT und seine Funktion bei der Moco-Sulfurierung aufklären zu können, wurde ABA3-CT in dieser Arbeit separat rekombinant exprimiert und charakterisiert. Die Größe von ABA3-CT wurde dabei basierend auf Sequenz-Homologien zu

anderen Moco-Sulfurasen mit einer Größe von 308 Aminosäuren beginnend bei Aminosäureposition 514 (bezogen auf das ABA3-Full-Length-Protein), festgelegt. Nachdem eine grundsätzliche, aber sehr schwache Bindung von MPT und/oder Moco an ABA3-CT gezeigt werden konnte (eigene Diplomarbeit, 2003), lag ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Verifizierung und der Charakterisierung dieser Cofaktorbindung sowie auf der Frage, welche Funktion ABA3-CT bei der Moco-Sulfurierung übernimmt.

### 3.2 Rekombinante Überexpression von ABA3-CT

ABA3-CT wurde als Fusionskonstrukt mit einem NH<sub>2</sub>-terminalen 6xHis-Tag rekombinant in *E. coli* überexprimiert und mit einer Ausbeute von 5-15 mg löslichem Protein/L Expressionskultur erhalten. Die Reinheit des Proteins wurde nach affinitätschromatographischer Aufreinigung im SDS-PA-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft, was eine etwa 36 kDa große Proteinbande von fast vollständiger Reinheit aufzeigte. Die Bande entsprach dabei der für ABA3-CT mit 6xHis-Tag kalkulierten Größe von 36,2 kDa. Der entsprechend aufgereinigte ABA3-CT konnte für nahezu alle nachfolgenden Experimente eingesetzt werden. Über Größenausschluss-Chromatographie konnte gezeigt werden, dass der native ABA3-CT im Gegensatz zum Full-Length-Protein und zu ABA3-NifS als Monomer vorliegt und somit nicht an der Vermittlung der Dimerisierung des Proteins beteiligt ist. ABA3-CT wies eine bräunliche Färbung auf, die als erster Hinweis auf die Bindung von MPT/Moco gesehen wurde. Um eine Synchronisierung der Protein- und Cofaktor-Biosynthese in *E. coli* zu erreichen, erfolgte die ABA3-CT-Expression bei einer reduzierten Temperatur von 22 °C und bei reduziertem Expressionslevel, indem nur 15 µM IPTG zur Induktion der Expression eingesetzt wurden. Nachdem die Expressionsbedingungen im Hinblick auf die Biosynthese und damit auf eine mögliche Bindung des Cofaktors optimiert wurden, konnte über FormA-Analyse ein durchschnittlicher Anteil von 35 % co-gereinigtem Cofaktor an ABA3-CT nachgewiesen und damit eine hoch affine Cofaktorbindung an ABA3-CT verifiziert und als spezifisch angesehen werden. In Co-Inkubationsversuchen mit freiem Moco und ABA3-CT konnte schließlich ein K<sub>D</sub>-Wert von 0,55 ± 0,14 µM bestimmt werden, was die hoch affine Bindung des Moco an ABA3-CT untermauerte. Da mittels FormA-Analyse sowohl Moco als auch die molybdänfreie Form MPT nachgewiesen wird, wurde die Art des gebundenen Cofaktors weiter charakterisiert. ABA3-CT zeigte sich im *nit-1* Assay zur Rekonstitution der *N. crassa*-NADPH-NR auch ohne zusätzliche Zugabe von Molybdat befähigt, wodurch die Bindung auch von Moco zunächst biologisch nachgewiesen werden konnte. Dies wurde nachfolgend über den Nachweis von Molybdän am ABA3-CT mittels ICP-

MS bestätigt und führte zudem zu einer Quantifizierung des Moco-Anteils an der Gesamtcofaktormenge. Es zeigte sich, dass etwa 70 % des gebundenen Cofaktors durch Moco repräsentiert wird. Somit konnte ABA3 eindeutig als ein neues Moco-bindendes Protein charakterisiert werden, wobei ABA3-CT als cofaktorbindende Domäne fungiert. Die Fähigkeit neben Moco auch das molybdänfreie MPT zu binden, wurde zusätzlich deutlich nach Expression von ABA3-CT im MPT-akkumulierenden *E. coli*-Stamm RK5206. Auch hier wurde Cofaktorbindung an ABA3-CT nachgewiesen, die demnach ausschließlich auf die Bindung von MPT zurückgehen muss. Die Expression von ABA3-CT im Moco-akkumulierenden *E. coli* Stamm TP1000 ohne Zugabe von Molybdat führte wiederum zu einer deutlichen Reduktion der Gesamtcofaktormenge, was für eine Molybdat-abhängige Co-Reinigung des Cofaktors spricht. Die Gesamtcofaktormenge lag bei nur noch 10 %, wovon nur 13 % auf Moco zurückgingen. Somit kommt es zwar zu einer bevorzugten Bindung von Moco, jedoch handelt es sich hierbei offenbar nicht um eine selektive Bindung. Der Anteil von 35 % co-gereinigtem Cofaktor an ABA3-CT kann dabei als recht hoch eingeschätzt werden, da es sich bei ABA3 nicht um ein Molybdoenzym handelt, das den Cofaktor als prosthetische Gruppe bindet, sondern um ein Protein, das seine Funktion in der posttranslationalen Aktivierung der Monooxo-Hydroxylasen erfüllt. Zu solchen Moco-bindenden Proteinen ohne die Funktion eines Molybdoenzyms gehört auch das MCP aus *C. reinhardtii*, das nach ähnlichen Expressionsbedingungen wie für ABA3-CT eine Moco-Saturierung von 25 % aufweist (Fischer *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu ABA3-CT bindet MCP jedoch ausschließlich Moco und kein MPT. Für MCP wurde eine Vermittlung der Moco-Bindung über das Erkennen des Metallzentrums des Cofaktors vorgeschlagen (Fischer *et al.*, 2006), da ABA3-CT aber auch MPT bindet, wird hier die Bindung des Cofaktors vermutlich eher über das Pteringerüst des Cofaktors vermittelt.

Nachdem das Binden von Moco an ABA3-CT zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, ergab sich die Frage nach den Liganden des Molybdänzentrums. Es sollte überprüft werden, ob der an ABA3-CT gebundene Moco einen terminalen cyanolisierbaren Schwefel aufweist und somit bereits die aktive Form des Cofaktors der Monooxo-Hydroxylasen besitzt. Da es sich hierbei um einen cyanolisierbaren Schwefel handelt, erfolgte der Nachweis über die Bildung eines Thiocyanats nach Cyanidbehandlung. Um einen Einfluss von möglicherweise vorhandenen Persulfid-Schwefeln zu verhindern, wurde das Protein mit TCEP vorbehandelt. Die Quantifizierung des gebildeten Thiocyanats ergab, dass 64 % des Moco bereits in sulfurierter Form an ABA3-CT aufgereinigt wurden. Somit konnte nachgewiesen werden, dass ein großer Teil des gebundenen Moco in der sulfurierten Form vorliegt und somit wahrscheinlich dem Moco von aktiver AO und XDH entspricht.

### 3.3 Rekombinante Überexpression von HMCS-CT

Erstmals konnte in dieser Arbeit auch die C-terminale Domäne der humanen Moco-Sulfurase (HMCS-CT) exprimiert und nachfolgend charakterisiert werden. Auch hier wurde der Umfang der C-terminalen Domäne anhand von Alignments mit anderen Moco-Sulfurasen festgelegt, woraus sich eine Größe von 322 Aminosäuren beginnend bei Aminosäureposition 568 (bezogen auf das HMCS Full-Length-Protein) für den C-Terminus ohne die Linker-Sequenz ergab. Dieser mit einem NH<sub>2</sub>-terminalen 6xHis-Tag versehene HMCS-CT wies nach affinitätschromatographischer Aufreinigung im SDS-PA-Gel eine Größe von etwa 38 kDa auf, was gut mit der kalkulierten Größe von 37,3 kDa korrelierte. Insgesamt erwies sich HMCS-CT als stabiler als ABA3-CT, da es nicht in Niedrigsalzpuffern oder basischen Puffern präzipitierte. Eine Begründung liegt möglicherweise in den unterschiedlichen theoretischen isoelektrischen Punkten beider Proteine (6,97 bei ABA3-CT und 8,03 bei HMCS-CT). An HMCS-CT konnte ebenfalls gebundener Cofaktor nach rekombinanter Expression in *E. coli* über FormA-Analyse nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich für HMCS-CT jedoch eine signifikant höhere Gesamtofaktorbeladung als bei ABA3-CT. Im Durchschnitt konnten  $1,79 \pm 0,43$  mol FormA/mol HMCS-CT nachgewiesen werden. Untermauert wurde dieses Ergebnis durch die Molybdänanalyse mittels ICP-MS, die  $1,42 \pm 0,02$  mol Molybdän/mol HMCS-CT nachwies. Gleichzeitig bedeutete dies, ähnlich wie bei ABA3-CT, einen Anteil von nahezu 80 % Moco an der Gesamtofaktorbeladung und somit ebenfalls eine zwar bevorzugte aber nicht ausschließliche Bindung des Moco im Vergleich mit Molybdän-freiem MPT. Der hohe Cofaktor-Gehalt an HMCS-CT wurde zusätzlich durch eine weitere unabhängige FormA-Bestimmung am Institut für Biochemie der Universität Köln bestätigt, die eine FormA-Menge von  $1,18 \pm 0,03$  mol FormA/mol HMCS-CT ergab, so dass die Bindung von bis zu zwei Molekülen Cofaktor pro HMCS-CT *in vivo* nicht ausgeschlossen werden kann. Die Thiocyanatbestimmung an HMCS-CT nach Cyanidbehandlung erbrachte auch für das humane Protein den Nachweis für sulfurierten Moco. Durchschnittlich 44 % des Moco konnten an HMCS-CT bereits in der sulfurierten Form aufgereinigt werden. Die für HMCS-CT ermittelten Daten zeigten somit die Möglichkeit von zwei gebundenen unterschiedlichen Subspezies des Cofaktors auf, die sich eventuell in ihrem Sulfurierungsstatus unterscheiden.

### 3.4 **Besitzt ABA3-CT eine Moco-Insertase-/Transferase-Funktion?**

Aus der Bindung von sulfuriertem Cofaktor sowohl an ABA3-CT als auch HMCS-CT ergab sich eine mögliche Erklärung der Relevanz der C-terminalen Domänen bei der Moco-Sulfurierung. Um einen möglichen Einfluss auf die Zielproteine AO und XDH zu untersuchen, wurde Cofaktor-beladener ABA3-CT mit AO und XDH aus *A. thaliana* coinkubiert und nachfolgend eine Aktivitätsfärbung mit diesen Enzymen durchgeführt. Im nativen PA-Gel konnte nach Aktivitätsfärbung tatsächlich bei beiden Proteinen ein positiver Einfluss durch ABA3-CT erreicht werden. Zudem konnte bei beiden Proteinen ein verändertes Migrationsverhalten der Aktivitätsbanden beobachtet werden, wodurch eine Interaktion zwischen ABA3-CT und den Enzymen der XO-Familie gezeigt wurde, die mit einer Überaktivierung dieser Proteine einhergeht. Ähnliche Ergebnisse brachte eine Co-Inkubation von HMCS-CT mit einer rekombinanten Maus-AO. Auch hier konnte eine Überaktivierung der AO sowie ein verändertes Laufverhalten der AO-Aktivitätsbande und somit Interaktion mit HMCS-CT beobachtet werden. Eine solche Überaktivierung könnte durch die Bereitstellung des sulfurierten Cofaktors für die Zielproteine bzw. durch die Bereitstellung des Schwefelliganden zur Sulfurierung des Cofaktors an AO und XDH erzielt werden.

Um näher auf die mögliche Art der Aktivierung von AO und XDH durch die C-Termini einzugehen, muss auf Unterschiede zwischen eukaryotischer und prokaryotischer Moco-Insertion bzw. -Sulfurierung eingegangen werden. Der Ablauf der Insertion des fertigen Moco in die Apoenzyme ist bei Eukaryoten noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise wird diese Aufgabe bei *A. thaliana* von Cnx1 übernommen, das die Bildung des Moco aus MPT katalysiert (Schwarz *et al.*, 2000), oder aber durch die Familie der Lysin-Decarboxylase-ähnlichen Proteine, die auf struktureller Ebene starke Ähnlichkeiten zu MCP aufweisen (Fischer *et al.*, 2006), gewährleistet. Da in allen bisher charakterisierten Moco-Sulfurase-Mutanten die Molybdoenzyme der XO-Familie bereits mit gebundenem Moco vorliegen, kann es als unwahrscheinlich angesehen werden, dass die Moco-Sulfurasen den sulfurierten Cofaktor in Moco-freie Apo-Proteine inserieren (Schwartz *et al.*, 1997; Leydecker *et al.*, 1995; Sagi *et al.*, 1999). Die inaktiven Enzyme in den Moco-Sulfurase-Mutanten können *in vitro* durch chemische Sulfurierung mittels Sulfid/Dithionit aktiviert und anschließend durch Cyanidzugabe erneut inaktiviert werden, was beweist, dass lediglich der terminale Schwefel fehlt. Bei der enzymatischen Sulfurierung durch die Moco-Sulfurasen handelt es sich demnach um eine posttranslationale Aktivierung der Zielproteine. Anders sieht die Situation bei Prokaryoten aus, für die bisher keine Enzyme mit der Funktion einer Moco-Sulfurase identifiziert wurden. Die Insertion des Cofaktors in die Apoproteine erfolgt teilweise mit Hilfe von Enzym-spezifischen Chaperonen (Vergnes *et al.*, 2005; Genest *et al.*, 2005; Ivanov *et*

*al.*, 2003, 2004). Als ein solches Protein wurde auch XDH-C aus *R. capsulatus* identifiziert, das essentiell für die Maturierung des Apo-XDH-Proteins ist, welches eine  $(\alpha\beta)_2$ -heterodimere Struktur aufweist und stark homolog zu eukaryotischen XDH-Proteinen ist (Leimkühler *et al.*, 2003). Ebenso konnte eine Aktivitätssteigerung der XDH aus *C. acidovorans* durch die Co-Expression mit XDH-C aus *P. aeruginosa* erzielt werden, die auf eine Erhöhung der Moco-Saturierung von 0,16 mol/mol Protein auf eine 1:1-Saturierung mit Moco zurückzuführen war (Ivanov *et al.* 2003, 2004). Kürzlich konnte an XDH-C aus *R. capsulatus* die Bindung von sulfuriertem Moco gezeigt werden, der in dieser Form in das Apoenzym inseriert wird und dadurch die XDH aktiviert (Neumann *et al.*, 2006). Die Rolle von ABA3-CT muss jedoch *in vivo* eine prinzipiell andere als die von XDH-C sein, das eine Moco-Insertase darstellt. Grundsätzlich ist jedoch ein Austausch des desulfurierten Cofaktors an inaktiver AO und XDH durch den sulfurierten Cofaktor an ABA3-CT denkbar. Um einen möglichen Einfluss von ABA3-CT verbunden mit einer Cofaktor-Insertion *in vitro* zu testen, wurde ein ABA3-CT-Konstrukt erzeugt, das im Expressionsansatz mit XDH das *P. aeruginosa* XDH-C ersetzen sollte. Die Aktivitätsmessungen an der exprimierten XDH wurden von Manuela Trani an der Emory University in Atlanta durchgeführt. Es erfolgten Co-Expressionen des XDH-Konstruktes mit dem ABA3-CT-Konstrukt im Vergleich zur alleinigen Expression von XDH. Bei ersten Versuchen, die in Kolben durchgeführt wurden, zeigte sich eine Steigerung der XDH-Aktivität nach Co-Expression mit ABA3-CT um das 17- bis 26-fache, jedoch betrugen die Aktivitätssteigerungen nach Expressionen im Fermenter nur noch das 2,5- bis 2,8-fache und bei Fermentationen mit geringem Sauerstoffeintrag zeigte sich gar kein positiver Effekt durch ABA3-CT mehr. Zwar hatte ABA3-CT zumindest unter Bedingungen mit starkem Sauerstoffeintrag einen positiven Einfluss auf die XDH-Aktivität und ersetzte somit grundsätzlich die Funktion von XDH-C. Allerdings zeigte der Vergleich mit dem vollständigen XDH-ABC-Konstrukt insbesondere nach Expression im Fermenter große Unterschiede in der Aktivität, die bei vollständig mit Moco saturierter XDH um das 20- bis 50-fache höher lagen. Obwohl ABA3-CT prinzipiell die Funktion von XDH-C übernehmen kann, verfestigten diese Ergebnisse die Vermutung, dass ABA3-CT *in vivo* anders als XDH-C nicht die Rolle einer Moco-Insertase übernimmt. Die Aktivierung von AO und XDH durch die Moco-Sulfurasen muss auf eine andere Art erfolgen.

### 3.5 Analyse natürlicher Mutationen aus ABA3-CT und HMCS-CT

Dai *et al.* veröffentlichten 2005 eine *A. thaliana* –Mutante, die eine Punktmutation innerhalb der C-terminalen Domäne aufweist, welche auf Aminosäuresequenzebene zu einem Austausch eines unter allen Moco-Sulfurasen strikt konservierten Arginins (Position 723) zu einem Lysin führte. Die sogenannte *sir3-3*-Mutante konnte im Rahmen eines Sirtinol-Screenings, das Sirtinol-resistente *A. thaliana*-Mutanten selektierte, identifiziert werden. Bei Sirtinol handelt es sich um ein synthetisches Auxin-Derivat, dessen Gabe bei Wildtyp-Pflanzen eine Auxin-abhängige Antwort induziert. Im Rahmen dieser Antwort erfolgt die Umwandlung von HNA (2-hydroxy-1-naphthaldehyde) zu HNC (2-hydroxy-1-naphtoic acid), die durch die AO katalysiert wird. Da die Sirtinol-Resistenz der *sir3-3*-Mutante somit auf einen Ausfall oder eine Reduktion der AO-Aktivität zurückgeht, zeigte diese Mutante die Bedeutung der C-terminalen Domäne für die AO- und XDH-Aktivierung durch die Moco-Sulfurase. Um den Einfluss der *sir3-3*-Mutation nachvollziehen zu können, wurden sowohl die Pflanzen charakterisiert als auch eine rekombinante ABA3-CT-Variante analysiert, die die *sir3-3*-Mutation widerspiegelt. Die *sir3-3*-Pflanzen zeigten ein verlangsamtes Wachstum sowie insgesamt kleineren Wuchs und somit einen zwar ähnlichen, aber weniger ausgeprägten Phänotyp wie z.B. die *aba3-1*-Mutante, die eine Punktmutation in der NifS-ähnlichen Domäne aufweist (Bittner *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2001). Dies deutete auf einen „leaky“-Phänotyp hin, d.h. dass die Funktion der Moco-Sulfurase durch die *sir3-3*-Mutation möglicherweise nicht vollständig verloren gegangen ist. Untermuert wurde dies durch die AO- und XDH-Aktivitäten dieser Pflanzen, die im Vergleich zu denen bei Wildtyp-Pflanzen sehr stark, aber nicht vollständig reduziert waren. Die Proteinmengen von AO und XDH entsprachen hingegen dem der Wildtyp-Pflanzen. Darüber hinaus führte eine chemische Sulfurierung der *sir3-3*-Rohextrakte durch Sulfid und Dithionit zur Rekonstitution der AO- und XDH-Aktivitäten auf Wildtyp-Level, wodurch nachgewiesen werden konnte, dass die Punktmutation am ABA3-CT Einfluss auf die Sulfurierung der Zielproteine hatte. Dies dokumentierte eindeutig die Beteiligung des ABA3-CT bei der Moco-Sulfurierung *in vivo*. Die Charakterisierung der rekombinant exprimierten R723K-CT-Variante zeigte schließlich anhand von FormA-Analysen eine Reduktion der Gesamtofactormenge um 40 % im Vergleich zum ABA3-CT-Wildtyp-Protein. Diese Reduktion der Cofaktormenge konnte im *nit-1*-Assay bestätigt werden. Es muss als sehr unwahrscheinlich angesehen werden, dass die Reduktion der Gesamtofactormenge auf 60 % des Wildtyp-Levels ausreicht, um den *sir3-3*-Phänotyp hervorzurufen. Die Bestimmung des terminalen Schwefels am Moco erbrachte jedoch den Nachweis eines Anteils von maximal 2-8 % sulfuriertem Moco an der Gesamtofactormenge. Offenbar führte somit die schlechtere Cofaktorsättigung an R723K-CT zusammen mit der

überproportionalen Reduktion des sulfurierten Moco zur Ausprägung des *sir3-3*-Phänotyps mit einer zwar starken aber nicht vollständigen Reduktion der AO- und XDH-Aktivitäten. Dieser Einfluss der Mutation auf die Cofaktorbindung machte eine Beteiligung des mutierten Arginins an der Bindung oder an der Stabilisierung von sulfuriertem Moco wahrscheinlich und gab somit einen ersten Hinweis auf ein Moco-Bindemotiv an ABA3-CT. Zudem deutete sich erstmals ein Zusammenhang zwischen der Notwendigkeit der Cofaktorbindung und der Funktion von ABA3 als Moco-Sulfurase an. Die Ergebnisse legten nahe, dass die Bindung eines sulfurierten Moco an ABA3 essentiell für die Funktion des Proteins ist.

Untermauert wurden diese Annahmen durch die Analyse einer HMCS-Mutation, die bei Patienten mit Xanthinurie Typ II auftritt. Bei einigen dieser Patienten konnte die Xanthinurie auf eine Punktmutation in der C-terminalen Domäne von HMCS zurückgeführt werden, die auf Aminosäuresequenzebene zu einem Austausch des Arginins an Position 776 zu einem Cystein führt (Peretz *et al.*, 2007). Interessanterweise entspricht hierbei das Arginin 776 von HMCS dem in der *sir3-3*-Mutante betroffenen Arginin 723 von ABA3. Die Analyse der rekombinant exprimierten HMCS-CT-Variante R776C-CT, die diese Mutation widerspiegelt, zeigte einen drastischen Einfluss des Austausches auf die Cofaktorbindung. Die FormA-Analyse wies eine auf durchschnittlich 3 % reduzierte Gesamtcofaktormenge im Vergleich zum HMCS-CT-Wildtyp-Protein nach. Im Molybdat-freien *nit-1*-Assay konnte keine NADPH-NR Rekonstitutionsaktivität und somit kein Moco nachgewiesen und auch kein terminaler Schwefel bestimmt werden. Zusammenfassend zeigt die R776C-CT-Variante somit eine starke Reduktion der Cofaktormenge, die offenbar ausschließlich auf Molybdän-freies MPT zurückgeht. Die völlige Abwesenheit von sulfuriertem Moco könnte somit die in Patienten auftretende Xanthinurie erklären, der der vollständige Aktivitätsverlust von AO und XDH zugrunde liegt. Dies belegt zum einen die Relevanz des strikt konservierten Arginins für die Bindung des Moco und zum anderen die Bedeutung des sulfurierten Moco am C-Terminus für die Moco-Sulfurierung von AO und XDH. Der Aminosäureaustausch in der humanen Mutation ist weitaus drastischer als der in der pflanzlichen *sir3-3*-Mutation, in der die basische Aminosäure Arginin durch das ebenfalls basische Lysin ausgetauscht wurde. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es bei der R776C-CT-Variante durch das Einfügen des Cysteins zu strukturellen Problemen bei der Proteinfaltung und damit zu einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur kommt. Um Genaueres über die Bedeutung des Arginins 776 zu erfahren, wurde auch für HMCS-CT in Form von R776K-CT eine schwächere Variante erzeugt, die der *sir3-3*-Mutation entspricht. Parallel hierzu wurden zum einen die HMCS-CT-Varianten F775Y-CT und N778Q-CT aus der strikt konservierten Umgebung des Arginins 776 erzeugt, um den Einfluss dieses Sequenzabschnittes auf die Cofaktorbindung zu untersuchen. Zum anderen wurde mit P591S-CT eine weitere Mutation aus Patienten mit



Xanthinurie Typ II nachvollzogen (Hava Peretz, persönliche Mitteilung) und mit S594A-CT eine zusätzliche Variante aus diesem ebenfalls strikt konservierten Sequenzabschnitt erzeugt und charakterisiert.

Auch an der schwächeren Variante R776K-CT wurde eine Reduktion der Cofaktormenge bestimmt, die 41 % im Verhältnis zu HMCS-CT betrug. Die Mutation des Asparaginrestes an Position 778 führte mit 48 % Cofaktormenge zu ähnlichen Ergebnissen. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Molybdänanalyse mittels ICP-MS, die eine Reduktion der Molybdänmenge auf 40 % an R776K-CT und auf 45 % an N778Q-CT ergab. Für beide Varianten konnte zudem kein cyanolisierbarer Schwefel am Moco nachgewiesen werden. Diese beiden HMCS-CT-Varianten zeigten somit eine auf etwa die Hälfte reduzierte Moco-Saturierung bei gleichzeitigem vollständigem Verlust des sulfurierten Cofaktors. Ähnliche Eigenschaften wies die S594A-CT-Variante auf, bei der zwar nur ein Rückgang der MPT/Moco-Menge auf 74 % bestimmt wurde, die aber ebenfalls stark reduzierte Mengen an sulfuriertem Moco aufzeigte. Diese Mutationen innerhalb der C-terminalen Domäne führten somit zum Verlust bzw. zu starker Erniedrigung des sulfurierten Moco, so dass eine Beteiligung dieser Aminosäurereste an der Bindung oder Stabilisierung des sulfurierten Moco angenommen werden kann.

Im Gegensatz dazu wies die dritte Variante aus dem „FRXN“-Motiv, F775Y-CT, mit 107 % FormA im Vergleich zu HMCS-CT Wildtyp-ähnliche Mengen an gebundenem Cofaktor auf. Bestätigt wurde dies durch die ICP-MS-Bestimmung der Molybdänmenge, die mit 116 % etwas höher als bei HMCS-CT ausfiel. Unterschiede zeigten sich allerdings bei der NADPH-NR Rekonstitutionsrate im *nit-1*-Assay. Hier lag die Aktivität von F775Y-CT mit 160 % deutlich höher als beim Kontrollprotein. Da die rekonstituierte NR im *nit-1*-Assay den Dioxo-Moco bindet, könnten höhere NR-Aktivitäten durch einen höheren Anteil an unsulfuriertem und damit „*nit-1*-aktivem“ Moco erzielt werden. Durch die ICP-MS-Analyse und FormA-Bestimmung an F775Y-CT wurde gezeigt, dass das Moco-zu-MPT-Verhältnis dem des Kontrollproteins entspricht, so dass die Möglichkeit bestand, dass die erhöhten Rekonstitutionsraten tatsächlich auf einen veränderten Sulfurierungsstatus des Proteins zurückzuführen sind. Leider erbrachte die Schwefelbestimmung an F775Y-CT jedoch keine klaren Resultate, so dass keine Aussagen über den Sulfurierungsstatus der Variante gemacht werden konnten und lediglich die Ergebnisse des *nit-1*-Assays eine Reduktion an sulfurierten Moco andeuten.

Die P591S-CT-Variante, die der zweiten in Patienten gefundenen Mutation entspricht, zeigte einen starken Rückgang der FormA-Menge auf 23 % im Vergleich mit HMCS-CT. Zusätzlich konnte im *nit-1*-Assay nahezu keine NADPH-NR Rekonstitution ohne Zugabe von Molybdat erzielt werden, so dass ein biologischer Nachweis des Moco nicht erbracht werden konnte.

Beide in Patienten nachgewiesene Mutationen führen somit zu einem drastischen Verlust des Moco bzw. zu einem Verlust des sulfurierten Moco. Da an rekombinant exprimiertem HMCS-CT durchschnittliche FormA-Mengen von 1,79 mol FormA/mol Protein bestimmt wurden und da vermutlich ein Teil des gebundenen Cofaktors während der Aufreinigung verloren geht, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass HMCS-CT prinzipiell in der Lage ist, bis zu zwei Moleküle des Cofaktors zu binden. Dieser Wert wurde in einzelnen Expressionen durchaus erreicht. Dies hätte somit zwei Moco-Bindemotive an HMCS-CT zur Voraussetzung. Der in dieser Arbeit bestimmte Anteil von 44 % sulfuriertem Moco am HMCS-CT-Wildtyp-Protein spricht für die Bindung von zwei unterschiedlichen Subspezies des Moco. Die Resultate der HMCS-CT Varianten R776K-CT, N778Q-CT und S594A-CT legen zudem nahe, dass die in diesen Varianten ausgetauschten Aminosäurereste spezifisch an der Bindung von sulfuriertem Moco beteiligt sind. Die Mutation dieser Aminosäurereste führt zu einem selektiven Verlust dieses Moco, wohingegen unsulfurierter Moco weiterhin gebunden wird. Dies würde voraussetzen, dass zwei Moco-Bindemotive an HMCS-CT mit unterschiedlicher Spezifität sulfurierten bzw. unsulfurierten Moco binden. Gegen die Beteiligung des Arginins 776 an einer spezifischen Bindung von sulfuriertem Moco spricht allerdings die Variante R776C-CT, bei der der gesamte Cofaktorgehalt stark reduziert ist. Sollte diese Mutation zu Problemen bei der Proteinfaltung und somit zu einer grundlegenden Veränderung der dreidimensionalen Struktur führen, könnte weiterhin von der Beteiligung an der Bindung von sulfuriertem Moco ausgegangen werden. Ist dies jedoch nicht der Fall, so fällt diesem Arginin eine grundsätzliche Rolle bei der Bindung des Cofaktors unabhängig von seinem Sulfurierungsstatus zu.

### **3.6 Spektroskopische Eigenschaften von ABA3-CT**

Wird ABA3-CT unter den für die Moco-Biosynthese optimierten Bedingungen exprimiert, weist er eine deutliche Braunfärbung auf. Es war zu vermuten, dass diese Färbung auf die Bindung des Moco zurückzuführen ist, was im Verlauf dieser Arbeit zweifelsfrei bestätigt werden konnte. Um detaillierte Kenntnis über die Absorptionseigenschaften von ABA3-CT zu erlangen, wurden UV/VIS-Spektren im Wellenlängenbereich von 200 bis 900 nm aufgenommen. Neben der für Proteine charakteristischen Absorption bei 280 nm wies ABA3-CT diverse charakteristische Absorptionen im Wellenlängenbereich von 300 bis 600 nm auf. Interessanterweise unterscheiden sich die Absorptionseigenschaften des Proteins direkt nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und nach 24 h Luftoxidation. Frisch aufgereinigter ABA3-CT zeigt Absorptionen um 315 nm und 465 nm, sowie eine zusätzliche

Schulter im Bereich von 350-400 nm und leichte Absorption um 550 nm. Nach 24 h Luftoxidation tritt ein Spektrum mit insgesamt stärkerer Ausprägung der spektralen Eigenschaften auf, was markantere Absorptionen bei 315 nm und 465 nm und zusätzlich ein deutlich ausgeprägtes Maximum bei 395 nm beinhaltet. Hingegen ist ein Verlust der Absorption im langwelligeren Bereich nach Luftoxidation zu beobachten, was nahe legt, dass diese Absorption oxidationssensitiv ist. Unterstützt wurde diese Vermutung durch das UV/VIS-Spektrum von unter anaeroben Bedingungen aufgereinigtem ABA3-CT. Hier zeigt das Protein deutliche Absorption im Wellenlängenbereich von 500-550 nm, die nach Luftoxidation ebenfalls verloren geht. Dies lässt vermuten, dass der gebundene Cofaktor zumindest teilweise in reduzierter Form co-gereinigt wurde und nachfolgend oxidiert wird.

Um die Herkunft der Absorptionsmaxima eindeutig der Bindung von Moco bzw. MPT zuordnen zu können, wurden die Absorptionseigenschaften von ABA3-C-Termini, die in unterschiedlichen *E. coli* Expressionsstämmen exprimiert wurden, miteinander verglichen. Neben der Expression in TP1000 wurde ABA3-CT im *mogA*-Stamm RK5206 exprimiert, der defekt in der Umwandlung des MPT zu Moco ist und somit Molybdän-freies MPT akkumuliert. Der Expressionsstamm RK5204 kann weder Moco noch MPT bilden und wurde zur rekombinanten Expression des Cofaktor-freien ABA3-CT genutzt. Da das Spektrum dieses Cofaktor-freien ABA3-CT im Bereich von 300-600 nm keinerlei Absorption aufweist, konnte nachgewiesen werden, dass sämtliche spektralen Eigenschaften von ABA3-CT ausschließlich auf die Bindung von Moco/MPT zurückgeführt werden können. Somit kann auch die mögliche Bindung weiterer chromophorer Cofaktoren an ABA3-CT unter den verwendeten Expressionsbedingungen ausgeschlossen werden. Der MPT-bindende ABA3-CT zeigt lediglich die Absorption bei 315 nm, die somit aus der Bindung des MPT resultieren muss und nicht Moco-spezifisch ist. Ein solches distinktes Absorptionsmaximum bei 315 nm konnte bisher für kein anderes Molybdoenzym gezeigt werden und ist offenbar bisher einzigartig für die Bindung des MPT an ABA3-CT. Allerdings weist das UV/Vis-Spektrum der XDH aus *A. thaliana* eine Absorption im Bereich von 310-330 nm auf, das der Bindung des Moco zugeschrieben wird (Dissertation Christine Hesberg, 2004), da freie Pterine in diesem Wellenlängenbereich absorbieren (Viscontini, 1971). Alle anderen bei ABA3-CT beobachteten Absorptionseigenschaften treten ausschließlich bei ABA3-CT aus dem Expressionsstamm TP1000 auf und können somit auf die Bindung des Moco zurückgeführt werden. Am Sichersten kann hierbei das Absorptionsmaximum bei 395 nm zugeordnet werden, da es bereits für andere Molybdoenzyme beschrieben wurde (MCP: Fischer *et al.*, 2006; pflanzliche und tierische SO: Eilers *et al.*, 2001; Garrett und Rajagopalan, 1996). Es wird der Bindung der Dithiolengruppe an das Molybdänzentrum zugeschrieben, was zusätzlich die Zuordnung dieser Absorption zum Moco bestätigt. Die anderen beobachteten Absorptionen können zwar

nicht eindeutig zugeordnet werden, an manchen Molybdoenzymen der SO-Familie wurde allerdings eine Absorption im Bereich von 400-500 nm beobachtet, für die die Bindung eines Cysteinliganden an das Molybdänzentrum verantwortlich gemacht wird (Garrett und Rajagopalan, 1996; Eilers *et al.*, 2001). Im Fall von MCP wurde für die Absorption in diesem Bereich die Bindung eines anderen Aminosäureliganden an das Molybdänzentrum vorgeschlagen, da MCP über keine proteineigenen Cysteine verfügt (Fischer *et al.*, 2006).

Über die Co-Inkubation von ABA3-CT mit verschiedenen Reduktionsmitteln wie Natriumdithionit, Natriumsulfid, DTT und TCEP sollte nachvollzogen werden, ob eine weitere Reduktion des Cofaktors möglich ist, die sich anhand von veränderten Absorptionseigenschaften verfolgen lässt. Hierzu wurden Absorptionsspektren sofort sowie nach 2 h und 24 h Coinkubation mit dem entsprechenden Reduktionsmittel aufgenommen. Interessanterweise entsprachen jedoch alle erhaltenen Spektren in der Ausprägung grundsätzlich dem durch Luftoxidation erhaltenen ABA3-CT-Spektrum mit sehr ausgeprägten Maxima bei 315, 395 und 465 nm. Die stärksten Absorptionen wies hierbei die mit Sulfid behandelte Probe auf. Es konnten jedoch keine neuen Absorptionen, insbesondere nicht die zuvor beobachtete Absorption um 550 nm beobachtet werden. Eine unter anaeroben Bedingungen durchgeführte Natriumdithionit-Titration führte jedoch zu Veränderungen des Absorptionsverhaltens von ABA3-CT. Zunehmende Mengen von Dithionit führten zu einem Absorptionsverlust bei 395 und 465 nm, wohingegen zwischenzeitlich das Auftreten einer Absorption im Bereich von 500-550 nm zu beobachten war, bevor das Protein vollständig seine sämtlichen Absorptionseigenschaften verlor. Da es sich hierbei um einen irreversiblen Prozess handelt, besteht die Möglichkeit, dass es zu einem kompletten Verlust des Cofaktors kam.

Co-Inkubation mit Ferricyanid als Oxidationsmittel führte erwartungsgemäß ebenfalls zur Ausprägung des „oxidierten“ Spektrums. Da in dieser Arbeit sulfurierter Moco an ABA3-CT nachgewiesen werden konnte, wurde außerdem überprüft, ob der sulfurierte Moco Einfluss auf die Absorptionseigenschaften des ABA3-CT hat. Hierzu wurde ABA3-CT mit Kaliumcyanid inkubiert, um den terminalen Schwefel in Form von Thiocyanat zu entfernen. Da jedoch auch mit Kaliumcyanid co-inkubierter ABA3-CT gleiche spektrale Eigenschaften aufwies wie das unbehandelte Protein, kann ein Einfluss des terminalen Schwefels auf die Absorptionseigenschaften von ABA3-CT ausgeschlossen werden. Somit lässt sich anhand des Absorptionsspektrums keine Aussage über den Sulfurierungsstatus des Proteins treffen.

### 3.7 Mögliche Rollen der konservierten Cysteinreste in ABA3-CT

Da sulfurierter Moco an ABA3-CT nachgewiesen werden konnte, konnte es als wahrscheinlich angenommen werden, dass dieser dem Moco der aktiven Molybdoenzyme der XO-Familie mit zwei Sauerstoff- und einem Sulfoliganden entspricht. Das UV/Vis-Spektrum von ABA3-CT weist jedoch eine nicht klar zugeordnete Absorption im Wellenlängenbereich von 450-500 nm auf, die in tierischer und pflanzlicher SO auf die Komplexierung des Molybdäns durch die Schwefel-Seitenkette eines proteineigenen Cysteinliganden zurückgeht. Insofern konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der Moco an ABA3-CT neben dem terminalen Schwefel ebenfalls einen solchen Cysteinrest als Liganden des Molybdäns aufweist. Die Aminosäuresequenz von ABA3-CT enthält neun Cysteinreste, von denen jedoch nur drei unter allen bisher beschriebenen Moco-Sulfurasen strikt konserviert sind. Innerhalb der ABA3-CT-Sequenz handelt es sich um ein Cystein an Position 542 und um zwei annähernd benachbarte Cysteine an den Positionen 755 und 758 (Positionen bezogen auf das Full-Length-Protein), die sich jeweils in stark konservierten Sequenzbereichen befinden. Falls ein Cysteinrest an der Ausbildung einer Ligandenbindung am Molybdän beteiligt wäre, so ist zu vermuten, dass es sich um einen solchen strikt konservierten Cysteinrest handelt. Die Mutation eines an der Ligandenbindung beteiligten Cysteins sollte sich in einer drastischen Veränderung des UV/Vis-Spektrums widerspiegeln, da im Falle der SO eine solche Mutation mit dem kompletten Absorptionsverlust ab 404 nm einhergeht (Garrett und Rajagopalan, 1996). Um eine mögliche Rolle dieser konservierten Cysteine an der Bindung des Molybdäns bzw. des Moco zu untersuchen, wurden Varianten von ABA3-CT erzeugt, bei denen jeweils eines dieser Cysteine durch ein Serin ersetzt ist. Neben der Analyse der Absorptionseigenschaften dieser Varianten wurde auch die Moco-Bindung im Vergleich zum Wildtyp-Protein charakterisiert.

Alle drei Cystein-Varianten konnten unter den für ABA3-CT optimierten Bedingungen exprimiert und aufgereinigt werden. Die Varianten C755S-CT und C758S-CT wurden in Wildtyp-Protein ähnlicher Menge und Reinheit erhalten. Die C542S-CT-Variante zeigte hingegen eine etwas schlechtere Ausbeute sowie teilweise eine geringere Reinheit als ABA3-CT, was eventuell auf Probleme bei der korrekten Proteinfaltung zurückzuführen ist. Die UV/Vis-Spektren aller drei Cystein-Varianten wiesen im Wesentlichen die Absorptionseigenschaften des Wildtyp-Proteins auf. Insbesondere zeigten alle Proteine nach Luftoxidation die für ABA3-CT typische Absorption bei 465 nm, für die als eine mögliche Ursache die Bindung eines proteineigenen Cysteinrestes an das Molybdänzentrum in Frage kam. Somit konnte bei keinem der mutierten Proteine eine Veränderung des UV/Vis-Spektrums beobachtet werden, die mit dem Wegfall einer entsprechenden Ligandierung

einhergehen sollte (Garrett und Rajagopalan, 1996). Hieraus kann geschlossen werden, dass keiner der mutierten strikt konservierten Cysteinreste als Ligand des Molybdänzentrums fungiert. Da es als eher unwahrscheinlich anzusehen ist, dass eines der sechs weiteren in ABA3-CT vorkommenden, nicht konservierten Cysteine das Molybdän ligandiert, ist anzunehmen, dass der an ABA3-CT gebundene Moco über keinen Cysteinschwefel-Liganden wie bei den Molybdoenzymen der SO-Familie verfügt.

Da im Falle eines Einflusses der Cystein-Mutation auf die Bindung oder Stabilisierung des Cofaktors mit abweichenden Mengen an gebundenem Cofaktor gerechnet werden konnte, wurden die Varianten entsprechend charakterisiert. C542S-CT wies im Vergleich zum Wildtyp-Protein mit durchschnittlich 160 % eine höhere Cofaktorsättigung auf, allerdings variierten die FormA-Werte stark innerhalb verschiedener Expressionsansätze. Zusätzlich konnte an C542S-CT der größte Anteil an sulfuriertem Moco unter den Cystein-Varianten nachgewiesen werden. Diese Variante bindet somit insgesamt mehr Cofaktor als ABA3-CT und weist darüber hinaus einen höheren Anteil an sulfuriertem Moco auf. Zugleich ist diese Variante jedoch mit den stärksten Schwankungen innerhalb verschiedener Expressionsansätze behaftet, so dass angenommen werden kann, dass die C542S-Mutation möglicherweise tatsächlich einen Einfluss auf die Faltung und Stabilität des Proteins hat.

Lediglich geringe Veränderungen der Cofaktorbindung konnten für die C755S-CT-Variante nachgewiesen werden. Die FormA-Analyse wies hier mit 84 % im Vergleich zu ABA3-CT leicht reduzierte Mengen an MPT/Moco nach. Diese leichte Reduktion des gebundenen Cofaktors konnte im NADPH-NR *nit-1*-Assay bestätigt werden. Ebenfalls konnten an dieser Variante geringfügig reduzierte Mengen an terminalem Schwefel am Moco nachgewiesen werden. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das Cystein 755 weder unmittelbar an der Moco-Bindung beteiligt ist, noch einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität und Faltung des Proteins hat.

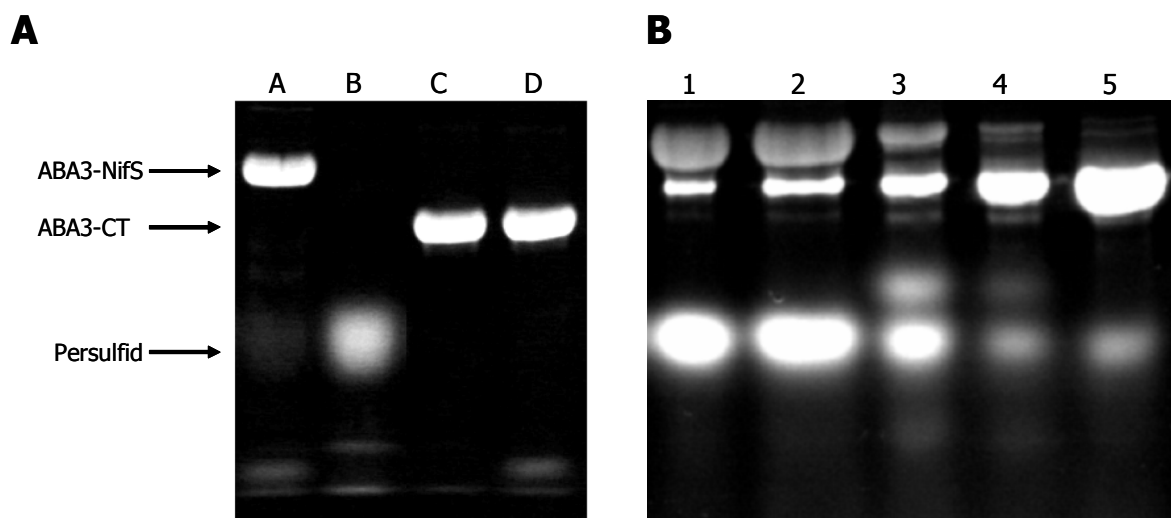
Gänzlich andere Ergebnisse lieferte die Charakterisierung der Cofaktorbindung an C758S-CT. Sowohl über die FormA-Analyse als auch über den *nit-1*-Assay konnten an C758S-CT stark erhöhte Cofaktormengen nachgewiesen werden. Es wurden 194 % FormA im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein nachgewiesen und die für diese Variante ermittelten *nit-1*-Rekonstitutionsraten lagen mit 215 bzw. 220 % noch höher. Hierbei lagen allerdings ähnliche Verhältnisse der Rekonstitutionsaktivitäten, die mit und ohne Molybdatzugabe erreicht wurden, vor, so dass von einem nahezu gleichen MPT/Moco-Verhältnis wie bei ABA3-CT ausgegangen werden konnte. Somit konnte ein größerer Moco-Anteil als Grund für die erhöhten Rekonstitutionsraten ausgeschlossen werden. Da im *nit-1*-Assay jedoch unsulfurierter Moco zur Rekonstitution der NR benötigt wird, deutete sich aufgrund der überproportional erhöhten *nit-1*-Rekonstitutionsraten ein größerer Anteil des unsulfurierten

Moco an der Gesamcofaktormenge des C758S-CT an. Interessanterweise konnte nachfolgend an C758S-CT tatsächlich nahezu kein terminaler Schwefel nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Menge des sulfurierten Moco ist hier auf 0,013 mol Thiocyanat/mol Protein reduziert. Die Mutation des Cystein 758 hat somit unmittelbaren Einfluss auf den Sulfurierungsstatus des gebundenen Moco und scheint mit der auf 200 % erhöhten Cofaktorsättigung zu einer „Akkumulierung“ von unsulfuriertem Moco zu führen. Damit ergibt sich für das Cystein 758 eine überraschende Bedeutung entweder für die Stabilisierung des sulfurierten Moco oder für die Bereitstellung des Schwefels zur terminalen Sulfurierung des Moco. Auch das Spektrum der C758S-CT-Variante weicht trotz des Verlustes des terminalen Schwefels am Moco nicht wesentlich vom üblichen ABA3-CT-Spektrum ab und bestätigt die nach Cyanid-Behandlung von ABA3-CT erhaltenen Spektren, die ebenfalls keine Veränderung der grundsätzlichen Absorptionseigenschaften aufwiesen.

### **3.8 Transfer eines Persulfid-Schwefels von ABA3-NifS zu ABA3-CT**

Das Binden von sulfuriertem Cofaktor an ABA3-CT sowie die mögliche Bedeutung eines Cysteinrestes von ABA3-CT für die terminale Sulfurierung des Moco warf die Frage nach dem Ursprung dieses Schwefels auf. Da ABA3-NifS eindeutig als PLP-abhängige L-Cystein-Desulfurase, die einen Persulfid-Schwefel generiert, identifiziert werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass der terminale Schwefel ursprünglich von ABA3-NifS stammt. Der Transfer eines Persulfid-Schwefels von Cystein-Desulfurasen auf Akzeptorproteine ist insbesondere bei den Proteinen der Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese ein häufig auftretender Mechanismus. Im Fall von NifS aus *A. vinelandii* fungiert beispielsweise das Plattform-Protein NifU als Akzeptor des Persulfid-Schwefels (Johnson *et al.*, 2005). Es war denkbar, dass ein solcher Transfer des Persulfid-Schwefels auch von ABA3-NifS auf ABA3-CT erfolgt, bevor dieser nachfolgend für die Sulfurierung des Moco an ABA3-CT genutzt wird. Um einen möglichen Persulfidtransfer *in vitro* nachweisen zu können, wurde Persulfid-gesättigtes ABA3-NifS mit Persulfid- und Moco-freiem ABA3-CT coinkubiert und anschließend über Größenausschluss-Chromatographie separiert. Anschließend wurden die separierten Proteinfractionen auf das Vorhandensein von Persulfid-Schwefeln hin untersucht. Dies erfolgte über das fluoreszierende Thiol-bindende Reagenz 1,5-I-AEDANS, das sowohl an Persulfide als auch an exponierte Cysteinreste bindet. Da eventuell vorhandene Persulfide inklusive des gebundenen 1,5-I-AEDANS im SDS-PA-Gel durch DTT abgespalten werden, können diese unter UV-Licht deutlich von den fluoreszierenden Proteinbanden unterschieden werden (Abb. 3-1). ABA3-NifS, das durch die Co-Inkubation mit L-Cystein vollständig mit

Persulfid abgesättigt wurde, weist nach Abspalten des Persulfid-Schwefels nahezu keine Proteinfluoreszenz, aber eine starke Persulfidfluoreszenz auf, während zuvor mit DTT-behandeltes ABA3-NifS kein Persulfidsignal, jedoch eine starke Proteinfluoreszenz zeigt (Abb. 3-1A). ABA3-CT hingegen zeigt unabhängig von der Co-Inkubation mit L-Cystein erwartungsgemäß keine Persulfidfluoreszenz, da das Protein über keine L-Cystein-Desulfurase-Aktivität verfügt. Nach Co-Inkubation und nachfolgender Trennung beider Proteine wurde schließlich eine ABA3-CT-Fraktion aufgereinigt, von der relativ große Mengen Persulfid-Schwefel abgespalten werden konnten (Abb. 3-1B). Da diese Fraktion nur minimal mit ABA3-NifS verunreinigt war, kam nur ABA3-CT als Persulfid-Quelle in Frage, wodurch der Transfer des Persulfid-Schwefels von ABA3-NifS zu ABA3-CT *in vitro* gezeigt werden konnte.

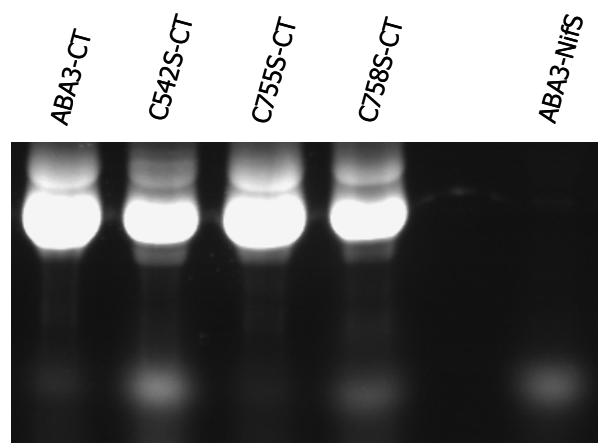


**Abb. 3-1: Schwefelübertragung von ABA3-NifS auf ABA3-CT.** A: ABA3-NifS weist nach Behandlung mit DTT kaum noch Persulfid-Schwefel auf (Spur A). Nach Inkubation mit L-Cystein ist ABA3-NifS mit Persulfid saturiert (Spur B). An ABA3-CT kann sowohl nach Inkubation mit DTT (Spur C) als auch mit L-Cystein (Spur D) kein Persulfid-Schwefel abgespalten werden. B: Persulfid-gesättigtes ABA3-NifS wurde mit Persulfid-freiem ABA3-CT coinkubiert und nachfolgend über Gelfiltration separiert. Spuren 1-5 zeigen Elutionsfraktionen. Spur 5 zeigt nahezu reinen ABA3-CT an dem Persulfid-Schwefel abgespalten werden konnte. Die zusätzlich auftretenden Fluoreszenzbanden können eindeutig Reaktionsprodukten von DTT mit 1,5-I-AEDANS zugeordnet werden (Dissertation Torsten Heidenreich, 2007)

Ein Transfer des Persulfid-Schwefels setzt einen Cysteinrest an ABA3-CT voraus, der den von ABA3-NifS kommenden Schwefel bindet. Es ist anzunehmen, dass eines der drei strikt konservierten Cysteine diese Rolle übernimmt. An ABA3-CT konnten sowohl durch das Binden von 1,5-I-AEDANS als auch von DTNB nachgewiesen werden, dass zwei der neun in ABA3-CT vorkommenden Cysteine exponiert vorliegen und somit in der Lage wären, ein Persulfid von ABA3-NifS zu übernehmen. Interessanterweise schlugen Anantharaman und Aravind (2001) eine solche Akzeptor-Rolle für ein konserviertes Cystein in den Moco-



Sulfurase-C-Termini vor. Aufgrund von Datenbankanalysen ordneten sie die Moco-Sulfurase-C-Termini in eine neue Domänen-Superfamilie ein, die sogenannten MOSC-Domänen. Unter Beteiligung eines hochkonservierten Cysteinrestes sollten die MOSC-Domänen Schwefel von der NifS-ähnlichen-Domäne übernehmen und auf das Zielprotein zur Bildung von Metall-Schwefel-Clustern übertragen. In ABA3-CT entspricht das Cystein 758 diesem vorgeschlagenen Cysteinrest. Da der nahezu vollständige Verlust des terminalen Schwefels am Moco der C758S-CT-Variante für eine Rolle des Cystein 758 bei der Sulfurierung des Moco sprach, konnte tatsächlich angenommen werden, dass dieser Cysteinrest als Persulfid-Bindestelle fungiert. Gegen das Vorhandensein eines Persulfid-Schwefels am Cystein 758 sprach jedoch schließlich ein Versuchsansatz, in dem die Persulfidbeladung von ABA3-CT sowie der Cystein-Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT direkt nach Aufreinigung durch einen 1,5-I-AEDANS *in Gel*-Assay nachvollzogen wurde (Abb. 3-2). Hierzu wurden die Proteine für 1 h bei 4 °C mit 1,5-I-AEDANS coinkubiert, so dass das 1,5-I-AEDANS sowohl an freie Cysteinreste als auch an eventuell vorhandene Persulfide binden konnte. Anschließend wurde überschüssiges 1,5-I-AEDANS durch die Zugabe von L-Cystein gebunden, bevor die Ansätze im SDS-PA-Gel aufgetrennt wurden. Durch das DTT im Ladepuffer wurde der an das 1,5-I-AEDANS gebundene Persulfid-Schwefel während des Gellaufs abgespalten und konnte als solcher unter UV-Licht identifiziert werden. Falls überhaupt ein Persulfid nach rekombinanter Expression in *E. coli* an ABA3-CT vorliegt, so sollte dies jedoch nicht für die C758S-CT-Variante zutreffen. Überraschenderweise konnte die größten Menge an Persulfid jedoch an den Varianten C542S-CT und C758S-CT nachgewiesen werden, wohingegen das Wildtyp-Protein und die Variante C755S-CT kaum Persulfid-Schwefel aufwiesen. Dies machte die Beteiligung des Cysteins 758 an einer Übertragung eher unwahrscheinlich.



**Abb. 3-2: Persulfid-Nachweis an ABA3-CT sowie den Varianten C542S-CT, C755S-CT und C758S-CT.** Je 50 µg der frisch gereinigten Proteine wurden mit 1,5-I-AEDANS inkubiert und Persulfid-Schwefel nachfolgend mittels DTT abgespalten. Persulfid-saturiertes ABA3-NifS wurde als Kontrolle mitgeführt. C542S-CT und C758S-CT weisen ebenso wie ABA3-NifS eine Persulfidfluoreszenz auf.

Um eine mögliche Rolle des Cystein 758 bzw. der beiden anderen konservierten Cysteinreste als Akzeptoren des Persulfid-Schwefels von ABA3-NifS zweifelsfrei klären zu können, sollte zukünftig für jede der Varianten überprüft werden, ob *in vitro* ein Persulfid von ABA3-NifS übernommen werden kann, ebenso wie dies beim Wildtyp-Protein möglich ist.

### 3.9 Mögliche *in vivo* Funktion der Moco-Sulfurase C-Termini

Durch die Charakterisierung von in Moco-Sulfurase-C-Termini auftretenden Mutationen wie beispielsweise der *flacca*-Mutante aus Tomate (Sagi *et al.*, 2002), konnte belegt werden, dass die C-terminalen Domänen der Moco-Sulfurasen *in vivo* von essentieller Bedeutung sind, obwohl die NH<sub>2</sub>-terminalen NifS-ähnlichen Domänen *in vitro* alleine zur Moco-Sulfurierung in der Lage sind (Heidenreich *et al.*, 2005). Im Verlauf dieser Arbeit konnte eindeutig die Bindung von sulfuriertem Moco an den C-terminalen Domänen von ABA3 und von HMCS nachgewiesen werden. Über die Charakterisierung rekombinant exprimierter C-Termini, die natürlich auftretende Mutationen in Pflanzen und in Menschen widerspiegeln, konnte schließlich auf die Relevanz dieses gebundenen sulfurierten Cofaktors für die Funktion der Moco-Sulfurasen geschlossen werden. Der *in vitro* geführte Nachweis des Persulfid-Schwefel-Transfers von ABA3-NifS auf ABA3-CT zeigt eine Möglichkeit der Herkunft des terminalen Schwefels am an ABA3-CT gebundenen Moco. Es kann als wahrscheinlich angesehen werden, dass ein solcher intramolekularer Schwefeltransfer auch *in vivo* erfolgt, da für alle Mechanismen, die von der Bildung eines Persulfid-Schwefels abhängig sind, gezeigt werden konnte, dass das Persulfid nach seiner Synthese zunächst auf einen Cysteinrest des Akzeptor-Proteins übertragen wird (Kessler, 2006). Ausgehend hiervon ist anzunehmen, dass die NifS-ähnliche Domäne nach Generierung des Persulfides in einem weiteren Schritt diesen Persulfid-Schwefel auf einen der drei konservierten Cysteinreste an der C-terminalen Domäne überträgt. Da letzten Endes ein sulfurierter Moco am C-Terminus vorliegt, kann angenommen werden, dass dieser Persulfid-Schwefel nachfolgend für die Sulfurierung dieses Moco eingesetzt wird. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zu weiteren intramolekularen Schwefel-Transfers kommt, da bisweilen solche „Schwefel-Staffel“-Systeme den Schwefel ans gewünschte Ziel liefern (Kessler, 2006). Da die rekombinant exprimierten Moco-Sulfurase C-Termini in Abwesenheit der NifS-ähnlichen Domäne exprimiert wurden, muss der terminale Schwefel, der an diesen Proteinen nachgewiesen wurde, von einer *E. coli*-eigenen L-Cystein-Desulfurase stammen. Im Falle des XDH-C-Proteins aus *R. capsulatus*, das ebenfalls sulfurierten Moco bindet, konnte eine mit „NifS4“ bezeichnete L-Cystein-Desulfurase der SufS-Klasse als Quelle des terminalen

Schwefels identifiziert werden (Neumann *et al.*, 2007). Es kann als wahrscheinlich angesehen werden, dass die Sulfurierung des Moco auch bei rekombinant in *E. coli* exprimiertem ABA3-CT und HMCS-CT auf diese Weise erfolgt.

Im Falle von XDH-C erfolgt anschließend ein Transfer des sulfurierten Moco in das Cofaktorfreie Apo-XDH-Protein, wodurch die Funktion von XDH-C als Moco-Insertase definiert wird (Neumann *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte zwar grundsätzlich eine schwache Komplementation der *P. aeruginosa* XDH-C-Funktion durch ABA3-CT im Expressionsansatz mit XDH nachgewiesen werden, jedoch sprechen die Analysen von pflanzlichen Moco-Sulfurase-Mutanten gegen eine Funktion von ABA3-CT als Moco-Insertase. Bisher zeigten alle charakterisierten Moco-Sulfurase-Mutanten eine normale Beladung der Zielproteine mit dem Cofaktor (Leydecker *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1997; Sagi *et al.*, 1999; diese Arbeit). Dies trifft sogar für Mutanten mit sehr stark trunkierten Moco-Sulfurasen wie etwa bei der *aba3/13-5*-Mutante zu, die kein Moco-Sulfurase Protein mehr bilden kann. Auch konnte in diesen Mutanten eine Rekonstitution der AO- und XDH-Aktivitäten auf Wildtyp-Niveau durch die chemische Sulfurierung mit Sulfid und Dithionit erzielt werden, was zeigt, dass in den eukaryotischen Moco-Sulfurase-Mutanten ausschließlich der terminale Schwefel, nicht aber der Moco, fehlt. Im Gegensatz hierzu weisen bakterielle XDH-C-Mutanten eine deutliche Reduktion des Cofaktorgehaltes im XDH-Zielprotein auf (Ivanov *et al.*, 2003, 2004). Sollte es sich bei der Moco-Sulfurierung der Eukaryoten dennoch um eine Moco-Insertion handeln, so müsste es somit bei den Moco-Sulfurase-Mutanten zu einer unspezifischen Insertion des „falschen“ unsulfurierten Cofaktors durch andere Enzyme als die Moco-Sulfurase kommen. Da eine Wildtyp-ähnliche Beladung von AO und XDH mit Moco auf diese Weise jedoch sehr unwahrscheinlich ist, sprechen die Befunde dieser Arbeit somit eher für eine posttranslationale Moco-Sulfurierung und gegen eine cotranslationale Insertion des sulfurierten Cofaktors in die Apo-Proteine. Da die cotranslationale Insertion des Cofaktors als unwahrscheinlich erscheint, ergeben sich prinzipiell zwei weitere denkbare Modelle zur Aktivierung der Zielproteine durch die Moco-Sulfurasen. Im ersten Modell, das ebenfalls als eher unwahrscheinlich angesehen aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, würde ausschließlich der terminale Schwefel des sulfurierten Moco an ABA3-CT auf den Moco von AO und XDH übertragen werden. In diesem Fall würde der gebundene Moco lediglich als Plattform dienen, um den ursprünglich von ABA3-NifS mobilisierten Persulfidschwefel in die vom Moco der Zielproteine benötigte Form zu bringen. Hierbei stellt sich aber die Frage nach der Notwendigkeit des an die C-Termini gebundenen Moco; ein direkter Transfer des auf ABA3-CT übertragenen Persulfid-Schwefels auf den Moco der Zielproteine erscheint einfacher und erfordert zudem keine komplexe Biosynthese des Moco. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass offenbar bis zu zwei Moleküle Moco pro Molekül HMCS-CT gebunden

werden können, erscheint diese Art der Aktivierung wenig wahrscheinlich. Das zweite Modell schließt den Austausch von unsulfuriertem gegen sulfuriertem Moco zwischen den Moco-Sulfurase C-Termini und den Zielproteinen ein. In diesem Fall würde an ABA3-CT ständig eine Art „Recycling“ des Cofaktors stattfinden. Anfangs unsulfurierter an ABA3-CT gebundener Moco würde durch den ursprünglich von ABA3-NifS stammenden Persulfid-Schwefel sulfuriert und stünde für die Aktivierung der Zielproteine bereit. Im Austausch würde unsulfurierter Moco von inaktiver AO bzw. XDH übernommen, der erneut an ABA3-CT sulfuriert werden könnte. Der Austausch des gesamten Moco würde zwar durch die Struktur der Enzyme der XO-Familie erschwert werden, da der Cofaktor tief in einer engen Tasche verborgen ist (Romão *et al.*, 1995; Huber *et al.*, 1996; Enroth *et al.*, 2000), jedoch spricht für dieses Modell der Nachweis von mehr als einem mol Cofaktor pro mol HMCS-CT. Sollten *in vivo* tatsächlich bis zu zwei Moleküle Moco an HMCS-CT binden können, so würde dies die Übernahme eines unsulfurierten Moco von den Zielproteinen bei gleichzeitigem „Vorhalten“ des sulfurierten Moco erleichtern. Dies würde zudem die Möglichkeit einer Regeneration des Moco an den Zielproteinen eröffnen. Sollte ein solcher posttranslatiionaler Austausch des Moco an den Proteinen der XO-Familie erfolgen, könnten alle Molybdoenzyme zunächst cotranslational gleichartigen Moco von den Proteinen der Moco-Biosynthese erhalten. Bei der Moco-Insertion würde somit nicht zwischen Molybdoenzymen der XO- bzw. SO-Familie unterschieden. Im Falle von zwei Moco-Bindemotiven wäre eine unterschiedliche Affinität dieser Bindemotive zu unsulfuriertem bzw. sulfuriertem Moco denkbar. Dass einige der in dieser Arbeit charakterisierten C-Terminus-Varianten einen selektiven Verlust des sulfurierten Moco bei Reduktion der Gesamtcofaktormenge auf 50 % aufwiesen, könnte ein erster Hinweis auf derartige unterschiedliche Bindemotive für sulfurierten und Schwefel-freien Moco sein. Einen Hinweis auf ein „Shutteln“ des Cofaktors zwischen Moco-Sulfurase C-Termini und Zielproteinen ergibt sich aus einer beobachteten Abnahme der XDH- bzw. XO-Aktivität nach Co-Inkubation mit Moco-freiem ABA3-CT bzw. HMCS-CT (Diplomarbeit Ralf Rethmeier, 2006). Bei einem Überschuss an größtenteils Moco-freiem C-Terminus war eine geringe Aktivitätsabnahme an XDH bzw. XO zu beobachten. Wurden jedoch die Moco-Sulfurase C-Termini entfernt und durch frische, ebenfalls größtenteils Moco-freie Proteine ersetzt, so sank die Aktivität der Zielproteine weiter, was auf ein Gleichgewicht zwischen den Moco-Beladungen von C-terminaler Domäne und Zielproteinen hindeutet.

Unabhängig davon, auf welche Art die Aktivierung der Molybdoenzyme der XO-Familie durch die Moco-Sulfurasen erfolgt, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne die Funktion von ABA3 als Moco-Sulfurase definiert, da erst hier die spezifische Verwendung des ansonsten universell einsetzbaren Persulfid-Schwefels erfolgt, der von ABA3-NifS übertragen wird.

### **3.10 mARC ist ein zu den Moco-Sulfurase C-Termini homologes Molybdoenzym**

Konnten zu Beginn dieser Arbeit den C-terminalen Domänen der Moco-Sulfurasen noch keine homologen Gen- oder Proteinfamilien zugeordnet werden, so änderte sich dies 2006 durch die Isolation und Identifizierung eines zum C-Terminus von HMCS homologen Proteins durch die Arbeitsgruppe um Prof. Bernd Clement am Pharmazeutischen Institut der Universität Kiel. Ursprünglich war es das Ziel, die fehlende dritte Komponente des sogenannten *N*-reduktiven Systems zu identifizieren. Es war bereits bekannt, dass Cytochrom  $b_5$  und Cytochrom  $b_5$ -Reduktase Komponenten dieses Systems sind, das in der Lage ist, *N*-hydroxylierte Amidoxime in einer NADH-abhängigen Reaktion zu den korrespondierenden Amidinen zu reduzieren. Diese Reaktion ist insofern von pharmazeutischer Relevanz, als dass *N*-hydroxylierte Amidine eine Klasse von Prodrugs darstellen, die erst durch Biotransformation in den aktiven Wirkstoff Amidin überführt werden (Clement *et al.*, 2002; Ettmayer *et al.*, 2004). Als Modells substrat fungiert hierbei das Benzamidoxim, das die *N*-hydroxylierte Struktur des Benzamidins darstellt. Nach mehreren Aufreinigungsschritten derjenigen Proteinfraktionen, die im rekonstituierten System mit Cytochrom  $b_5$  und seiner Reduktase die höchsten *N*-reduktiven Aktivitäten aufwiesen, konnte schließlich als dritte Komponente ein 35 kDa großes Protein über ESI-MS-Analysen identifiziert werden, das in den Datenbanken als „Moco Sulphurase C-terminal domain containing 2“ bezeichnet wird (Protein Accession: NP\_060368). Basierend auf seiner Fähigkeit Amidoxime zu reduzieren, wurde dieses isolierte Enzym nachfolgend in „mitochondrial Amidoxime Reducing Component“ (mARC) umbenannt. Da das mARC-Protein signifikante Sequenzhomologien zu den C-Termini der Moco-Sulfurasen aufweist, erfolgte in dieser Arbeit eine weitergehende Charakterisierung des Enzyms.

Zunächst erfolgte eine Immunodetektion des mARC-Proteins in den als Fraktion A und B bezeichneten Proteinfraktionen mit den höchsten *N*-reduktiven Aktivitäten durch den anti-ABA3-CT-Antikörper. Es konnte gezeigt werden, dass der Antikörper in beiden Fraktionen spezifisch das mARC-Protein mit einer Größe von 35 kDa erkennt. Diese Kreuzreaktion des gegen ABA3-CT gerichteten Antikörpers mit mARC ist neben den Homologien in der Primär-Aminosäuresequenz ein erster Hinweis auf eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem aus Schweineleber isoliertem mARC und den Moco-Sulfurase C-Termini. Aus diesen Ähnlichkeiten ergab sich die Frage, ob mARC ebenso wie ABA3-CT und HMCS-CT in der Lage ist, Moco/MPT zu binden, und somit ein neues Moco-bindendes Protein darstellt. Neben den aufgereinigten Fraktionen A und B wurde auch eine Fraktion der äußeren Mitochondrienmembran im *nit-1*-Assay auf ihre Fähigkeit zur Rekonstitution der NADPH-NR-Aktivität getestet. Es konnte sowohl in dieser OMV-Fraktion, als auch in den aufgereinigten

Fraktionen A und B NADPH NR-Rekonstitutionsaktivität unabhängig von der Molybdatzugabe bestimmt werden, wodurch nachgewiesen werden konnte, dass alle untersuchten mitochondrialen Fraktionen Moco-bindendes Protein enthalten. Die rekonstituierte Aktivität fiel hierbei in Fraktion A wesentlich höher aus als in den beiden anderen Fraktionen, was deutlich für das Binden des Cofaktors an mARC sprach. Der für Fraktion A berechnete Anreicherungsfaktor der NR-Rekonstitutionsaktivität von 46 gegenüber der OMV-Fraktion korrelierte hierbei mit der zuvor bestimmten Zunahme der *N*-reduktiven Aktivität um das 43-fache (Dissertation Antje Havemeyer, 2006). Die Ergebnisse des *nit-1*-Assays konnten mittels FormA-Analyse bestätigt werden, die ebenfalls eine Anreicherung des Cofaktorgehaltes in Fraktion A nachwies. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass es sich bei mARC aus Schweinelebermitochondrien um ein neues Moco-bindendes Protein handelt und zum anderen wurde die Ähnlichkeit zu den Moco-Sulfurase C-Termini untermauert. Es konnte als wahrscheinlich angenommen werden, dass die Moco-Bindung an mARC eine Voraussetzung für die Aktivität des Proteins im *N*-reduktiven System ist. Aufgrund der Ähnlichkeiten auch in Bezug auf das Binden des Moco, wurde HMCS-CT als Säugerprotein im rekonstituierten System mit Cytochrom  $b_5$  und Cytochrom  $b_5$ -Reduktase auf *N*-reduktive Aktivität getestet. HMCS-CT wurde hierzu sowohl in der Moco-bindenden als auch in der MPT-akkumulierenden und der gänzlich Cofaktor-freien Form exprimiert, um einen möglichen Einfluss der Cofaktorbindung auf die *N*-reduktive Aktivität zu untersuchen. Es konnte tatsächlich gezeigt werden, dass der Moco-bindende HMCS-CT, Benzamidoxim zu Benzamidin umsetzen konnte und somit *N*-reduktive Aktivität aufwies. Prinzipiell hat HMCS-CT also die Fähigkeit mARC enzymatisch zu ersetzen. Zudem zeigten sowohl der Cofaktor-freie als auch der MPT-bindende HMCS-CT keinerlei enzymatische Aktivität, wodurch die strikte Abhängigkeit der *N*-reduktiven Aktivität vom gebundenen Moco nachgewiesen werden konnte. Bei mARC handelt es sich somit um ein neu entdecktes eukaryontisches Molybdoenzym, das seine enzymatische Funktion zusammen mit Cytochrom  $b_5$  und seiner Reduktase erhält. Interessanterweise spiegelt diese Protein-Zusammensetzung des *N*-reduktiven Systems die Domänen-Struktur der eukaryotischen NR wider. Im Unterschied zum *N*-reduktiven System vereint die NR jedoch alle Komponenten mit ihren jeweiligen Cofaktoren (Moco, Häm und FAD) in Form von funktionellen Domänen in einem einzigen Polypeptid (Campbell, 1999). Die mARC-Proteine teilen allerdings keinerlei Homologien mit der Moco-bindenden Domäne der NR, sondern mit den C-Termini eukaryontischer Moco-Sulfurasen. Interessanterweise zeigte HMCS-CT im Gegensatz zum mARC-Protein auch in Ansätzen ohne Cytochrom  $b_5$  und Cytochrom  $b_5$ -Reduktase *N*-reduktive Aktivität und war somit grundsätzlich in der Lage, das aus drei Komponenten bestehende System zu ersetzen.

Zudem wies der Moco-haltige HMCS-CT auch ohne NADH-Zugabe *N*-reduktive Aktivität auf, wobei hier jedoch die spezifische Aktivität deutlich niedriger war.

In weiteren Versuchen konnte auch für ABA3-CT eine *N*-reduktive Aktivität nachgewiesen werden. ABA3-CT, HMCS-CT und mARC zeichnen sich demnach neben Sequenzhomologien und annähernd gleichen Größen von ca. 35 kDa, durch das Binden von Moco, ähnliche strukturelle Eigenschaften, und überraschenderweise auch durch grundsätzlich gleiche enzymatische Fähigkeiten aus.

Hierbei muss allerdings festgehalten werden, dass für ABA3-CT und HMCS-CT bisher nur *in vitro* gezeigt wurde, dass sie grundsätzlich in der Lage sind, mARC zu ersetzen. Inwiefern die Moco-Sulfurase C-Termini in der Lage wären, einen Ausfall der mARC-Aktivität *in vivo* zu rekonstituieren, ist nicht klar. Die angenommene unterschiedliche Kompartimentierung der mARC-Proteine in den Mitochondrien sowie der Moco-Sulfurasen im Cytosol würde eine Rekonstitution wahrscheinlich verhindern. In diesem Zusammenhang wäre die Analyse von mARC-Knockout-Mäusen bzw. -Pflanzen sehr interessant. Es kann jedoch als sehr unwahrscheinlich angesehen werden, dass die mARC-Proteine im Gegenzug die Funktion der Moco-Sulfurase *in vivo* übernehmen können, da alle bisher analysierten Mutanten mit einem Ausfall der Molybdoenzyme der XO-Familie auf eine Mutation der Moco-Sulfurase zurückgeführt werden konnten.

Die *in vivo*-Funktion der mARC-Proteine sowie die nativen Substrate des *N*-reduktiven Systems wurden bisher noch nicht identifiziert. Interessanterweise liefern jedoch Analysen von *E. coli*-Mutanten Hinweise zu einer möglichen *in vivo*-Funktion. Das Basenanalogon 6-*N*-Hydroxylaminopurin (HAP) stellt ein *N*-hydroxyliertes Derivat des Adenins dar und wirkt als Mutagen, da es in das korrespondierende dATP umgewandelt und als solches in die DNA eingebaut wird, was zu Basenfehlpaarungen führt, die nicht erkannt werden (Pavlov *et al.*, 1991;). *E. coli*-Stämme mit Mutationen in den Genen der Moco-Biosynthese wiesen eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber HAP auf, was belegt, dass eine Molybdoenzym-Aktivität an der HAP-Toleranz beteiligt ist (Kozmin *et al.*, 2000). Die Mutation aller bis dato bekannten oder putativen Molybdoenzyme führte jedoch nicht zur Ausprägung des „HAP-sensitiven“ Phänotyps und interessanterweise konnte über die Mutation des *mobA*-Gens gezeigt werden, dass das Enzym der HAP-Reduktion über die „eukaryotische“ MPT- und nicht über die typisch prokaryotische MGD-Form des Moco verfügt (Kozmin und Schaaper, 2007). Durch Wang und Schaaper konnten mit YcbX/CysJ und YiiM/Fre in *E. coli* zwei Proteinpaare identifiziert werden, die an der HAP-Resistenz beteiligt sind (persönliche Mitteilung Jian Wang und Roel M. Schaaper). Interessanterweise sind YcbX und YiiM zwei hypothetische Proteine der MOSC-Familie während CysJ und Fre NADPH-Flavin-Oxidoreduktase-Aktivität aufweisen. Für beide hypothetischen MOSC-Proteine konnte Moco über den *nit-1*-Assay nachgewiesen werden.

Beide Proteinpaare waren in der Lage HAP, NADPH-abhängig zu Adenin zu konvertieren, was einen Moco-abhängigen Detoxifikations-Mechanismus nachwies. Aufgrund von Homologien von YiiM und YcbX zu den mARC-Proteinen kann vermutet werden, dass den mARC-Proteinen *in vivo* ebenfalls eine Rolle bei der Detoxifikation von *N*-hydroxylierten Basenanalogen zukommt. Insbesondere das Binden des gleichartigen Moco untermauert diese Vermutung.

### **3.11 Bindet mARC sulfurierten Moco?**

Aus den ähnlichen enzymatischen Fähigkeiten ergab sich die Frage, ob die mARC-Proteine wie die Moco-Sulfurase C-Termini sulfurierten Moco binden und für die enzymatische Aktivität benötigen. Da in dieser Arbeit keine genaue Charakterisierung des Moco an rekombinant exprimierten mARC-Proteine erfolgen konnte, wurden die Cystein-Varianten aus ABA3-CT, die sich durch einen deutlich unterschiedlichen Sulfurierungsstatus ihres Moco auszeichnen, auf ihre Fähigkeit zur Benzamidoxim-Reduktion hin untersucht. Die Variante C542S-CT wies im Vergleich mit den Varianten C755S-CT und C758S-CT die höchste *N*-reduktive Aktivität auf. Da C542S-CT durch eine hohe Cofaktorbiladung und hohe Mengen an terminalem Schwefel charakterisiert ist, könnte dies ein erster Hinweis auf die Notwendigkeit eines sulfurierten Cofaktors sein. Entsprechend dazu zeigte C758S-CT, der durch ebenso hohe Cofaktormengen bei gleichzeitig stark reduziertem terminalen Schwefel gekennzeichnet ist, von den eingesetzten Varianten die geringste Aktivität. Es wurde zudem versucht, den Moco an ABA3-CT durch anaerobe Behandlung mit Dithionit und Sulfid chemisch noch stärker zu sulfurieren. Auch hier zeigte sich eine, wenn auch nur leichte, Erhöhung der *N*-reduktiven Aktivität im Vergleich zum unbehandelten Protein. Zwar kann keine klare Aussage zum für die Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität notwendigen Sulfurierungsstatus getroffen werden, jedoch legen diese Beobachtungen das Vorhandensein von sulfuriertem Moco an mARC nahe.

### **3.12 Klonierung und rekombinante Expression von hmARC2**

Offenbar bilden mARC-ähnliche Proteine in Eukaryonten eine Mini-Genfamilie, die stets aus zwei Mitgliedern besteht, da bisher in allen vollständig sequenzierten Eukaryonten-Genomen codierende Sequenzen für zwei mARC-Proteine gefunden wurden. Diese Gene liegen



bisweilen in Tandem-Orientierung auf einem Chromosom vor (z.B. in *H. sapiens*). Die Aminosäuresequenzen weisen zueinander jeweils Identitäten von 60-80% auf.

Die cDNA des humanen mARC2-Proteins (hmARC2) mit der Nucleotid Accession-Nummer NM\_017898 konnte in dieser Arbeit aus revers transkribierter mRNA aus humanen HepG2-Zellen isoliert, in den bakteriellen Expressionsvektor pQE80 kloniert und im *E. coli*-Expressionsstamm TP1000 rekombinant exprimiert werden. Nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung traten zwar starke Verunreinigungen mit unspezifisch an die Matrix gebundenen Proteinen auf und es zeigte sich zunächst keine dominierende Proteinbande erwarteter Größe. Jedoch konnte in der Western-Analyse eine Proteinbande mit einer Masse von ca. 38 kDa durch den anti-ABA3-CT-Antikörper detektiert werden. Durch den *nit-1*-Assay und die Form A-Analyse konnte Moco in den Elutionsfraktionen dieses Proteins nachgewiesen werden. Aufgrund der schlechten Reinheit des Proteins erfolgte zu diesem Zeitpunkt zwar keine Quantifizierung des Cofaktorgehaltes, doch mit dem grundsätzlichen Binden des Moco an das rekombinant exprimierte humane mARC-Homolog war eine wichtige Voraussetzung für die weitere Charakterisierung des Proteins erfüllt. Mittlerweile konnten sowohl die humanen (hmARC1 und 2) als auch die pflanzlichen Homologe (pmARC1 und 2) von mARC kloniert, rekombinant exprimiert und mit guter Reinheit erhalten werden (persönliche Mitteilung, Bettina Wahl). Für die pmARC-Proteine konnte eine hohe Cofaktorsättigung von bis zu 60-70 % erzielt werden, was die Rolle der mARC-homologen Proteine als echte Molybdoenzyme untermauert. Eindeutig konnte zudem die Spezifität dieser Proteine für die *N*-reduktive Reaktion belegt werden, da sie im Gegensatz zu HMCS-CT ohne Cytochrom  $b_5$  und Cytochrom  $b_5$ -Reduktase keine Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität zeigen. Mit dem Vorliegen der rekombinant exprimierten Proteine in dieser verbesserten Qualität kann nun auch der enzymatisch notwendige Sulfurierungsstatus des gebundenen Moco ermittelt werden. Zusätzlich kann basierend auf der Art des gebundenen Cofaktors eine Zuordnung der mARC-Proteine zu einer der Molybdoenzym-Familien erfolgen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Verwendete *E. coli*- und *P. pastoris*-Stämme

Tab. 4-1: Verwendete *E. coli* und *P. pastoris*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz	Kultivierung	Verwendung
<b><i>E. coli</i></b>				
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	F <sup>-</sup> supE44 $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 recA56	Hanahan (1983)	37 °C, LB	Klonierung
<b>DL41 (DE3)</b>	F <sup>-</sup> metA28 LAM -	Hendrickson, Horton & Lemaster, (1990)	37 °C, LB	Expression
<b>RK4353</b>	F <sup>-</sup> araD139 $\Delta$ (argF-lac)U169 deoC1 flbB5201 gyrA219 rel A1 rpsL150 nob-9 ptsF25	Stewart & MacGregor (1982)	37 °C, LB	
<b>RK5204</b>	RK4353 <i>chlA204::Mu cts</i>	(V. Stewart), Rivers <i>et al.</i> , 1993	30 °C, LB	Expression
<b>RK5206</b>	RK4353 <i>chlG206::Mu cts</i>	Stewart & MacGregor (1982)	30 °C, LB	Expression
<b>XL1-Blue</b>	$\Delta$ (mcrA)183 $\Delta$ mcrB-hsdSMR-mrr)173 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn5 (Kan <sup>R</sup> )].	Stratagene	37 °C, LB	Klonierung
<b>TP1000</b>	F <sup>-</sup> , lacU169, araD139, rpsL150, relA1, ptsF, rbsR, flbB, $\Delta$ (mobAB), Strep. R.	Palmer (1996)	37 °C, LB	Expression
<b><i>P. pastoris</i></b>				
<b>KM71</b>	Arg4, his4, aox1::ARG4	Invitrogen	30°C, YPD	Expression

#### 4.1.2 Plasmide

Tab. 4-2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Selektion	Referenz	Verwendung
<b>pQE80</b>	amp	Qiagen	Expression
<b>PBluescript II SK+</b>	amp, Blue-White	Stratagene	Klonierung, Sequenzierung
<b>PGEM-T easy</b>	amp, Blue-White	Promega	PCR-Klonierung
<b>pJET1/blunt</b>	Ampicillin	MBI Fermentas	PCR-Klonierung

### 4.1.3 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von den Firmen Eurogentec oder Sigma bezogen.

**Tab. 4-3: Verwendete Primer**

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz
<b>ABA3</b>		
CTermStart_BHI	PCR	TATATAGGATCCATGCAACTTCTTAGTGAAGACCTTGAA
CTermStop_BHI	PCR	CACAAGCGGATCCTTATTCAATATCTGGATTAACCTTCTTCCCC
CTforHindIII	PCR	ATCTCCAAGCTTATGCCTCAACTTCCTAGTGAAGACCTT
CTrevXhoI	PCR	ACGGTGCTCGAGTTATTCAATATCTGGATTAACCTTCTTC
R723C_for	PCR-Mutagenese	AATCCACATAGGTTCTGTCCAAATCTGGTTATA
R723C_rev	PCR-Mutagenese	TATAACCAGATTTGGACAGAACCTATGTGGATT
Sir3-3_for	PCR-Mutagenese	CAATCCACATAGGTTCAAACCAAATCTGGT
Sir3-3_rev	PCR-Mutagenese	ACCAGATTTGGTTTGAACCTATGTGGATTG
C542S_for	PCR-Mutagenese	TACCCGATCAAGTCATCTGCTGGATTTTCTGTG
C542S_rev	PCR-Mutagenese	CACAGAAAATCCAGCAGATGACTTGATCGGGTA
C755S_for	PCR-Mutagenese	ACATCATTGGGCGGTTCTAACCGGTGCCAGATG
C755S_rev	PCR-Mutagenese	CATCTGGCACCGGTTAGAACCGCCCAATGATGT
C758S_for	PCR-Mutagenese	GGCGGTTGTAACCGGAGCCAGATGATAAACATA
C758S_rev	PCR-Mutagenese	TATGTTTATCATCTGGCTCCGGTTACAACCGCC
<b>HMCS</b>		
HMCSfor_C1	PCR	TCCAGGGATCCATGTCAGCAGACAGCCAGGCTGATGTT
HMCSfor_C2	PCR	ACCCAGGGATCCATGTCAGAGAAAGCTGCAGGAGTCCTG
HMCSrevBHI	PCR	ACGGTGGATCCTTAGGAGGTAACATCCTGGTGTTC
P591S_for	PCR-Mutagenese	CACTAACCTTTATCTCTATTCAATCAAATCCTGTGCTGC
P592S_rev	PCR-Mutagenese	GCAGCACAGGATTTGATTGAATAGAGATAAAGGTTAGTG
S594A_for	PCR-Mutagenese	CTCTATCCAATCAAAGCCTGTGCTGCATTTGAGGTG
S594A_rev	PCR-Mutagenese	CACCTCAAATGCAGCACAGGCTTTGATTGGATAGAG
F775Y_for	PCR-Mutagenese	GATCTCAGCTTGC GTTATCGTGCCAATATTATTATC
F775Y_rev	PCR-Mutagenese	GATAATAATATTGGCACGATAACGCAAGCTGAGATC
R776C_for	PCR-Mutagenese	CTCAGCTTGC GTTTTTGTGCCAATATTATTATC
R776C_rev	PCR-Mutagenese	GATAATAATATTGGCACAAAAACGCAAGCTGAG
R776K_for	PCR-Mutagenese	GATCTCAGCTTGC GTTTTAAAGCCAATATTATTATCAATGG
R776K_rev	PCR-Mutagenese	CCATTGATAATAATATTGGCTTTAAACGCAAGCTGAGATC
N778Q_for	PCR-Mutagenese	GCTTGCGTTTTTCGTGCCCAAATTATTATCAATGGAAAAAGGGC
N778Q_rev	PCR-Mutagenese	GCCCTTTTTCCATTGATAATAATTTGGGCACGAAAACGCAAGC

<b>hmARC</b>		
AAH10619_for	5´-Fragment von hmARC1	ATATATGGATCCATGGGCGCCGCCGGCTCCTCCGCG
AAH10619_rev	3´-Fragment von hmARC1	AAATTTAAGCTTTTACTGGCCCAGCAGGTACACACAGG
NP060368_for	5´-Fragment von hmARC2	ATATATGGATCCATGGGCGCTTCCAGCTCCTCCGCG
NP060368_rev	3´-Fragment von hmARC2	ATAATTAAGCTTCTACACCATCCGATACACAGGGTC
AAH10619_2for	5´-Fragment von hmARC1	CAGGAGCTGCCCAGCCTTTGGGCT
AAH10619_2rev	3´-Fragment von hmARC1	CACCATGCTTCAAGTGTTGTCATT
NP060368_2for	5´-Fragment von hmARC2	TAGTTGGGTCAACTTTGACTCCTC
NP060368_2rev	3´-Fragment von hmARC2	TCCCTCCTGGTTGCTGAAGCCATA
AAH10619int_for	5´-Fragment von hmARC1	CTCAGTGCAGCCTACACAAAGGAC
AAH10619int_rev	3´-Fragment von hmARC1	GTGCACTCTGCACTTGTGCACTGC
NP060368int_for	5´-Fragment von hmARC2	TGTGGCAATGAGGCAGCTAAGTGG
NP060368int_rev	3´-Fragment von hmARC2	GCAGTAGTCTGGGTAGGCCACCTG

#### 4.1.4 Antikörper

**Tab. 4-4: Verwendete Antikörper**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Mono-/Polyklonal</b>	<b>Organismus</b>	<b>eingesetzte Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Primäre Antikörper</b>				
Anti-ABA3-CT	polyklonal	Kaninchen	1:7500	Trenzyme
Anti-His <sub>6</sub> -Tag	monoklonal	Maus	1:1000	Sigma
Anti-AO	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Trenzyme
Anti-XDH	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Trenzyme
<b>Sekundäre Antikörper</b>				
Anti-Maus-IgG	Polyklonal; AP-Konjugat	Ziege	1:3000	Sigma
Anti-Kaninchen-IgG	Polyklonal; AP-Konjugat	Ziege	1:7500	Sigma
Anti-Maus-IgG	Polyklonal; HRP-Konjugat	Schaf	1:2500	GE Healthcare
Anti-Kaninchen-IgG	Polyklonal; HRP-Konjugat	Affe	1:10000	GE Healthcare

#### 4.1.5 Häufig verwendete Chemikalien, Enzyme und Matrices

Die in speziellen Versuchen häufig eingesetzten Chemikalien sind nach Hersteller sortiert in der unten gezeigten Tabelle aufgeführt. Die übrigen gängigen Laborchemikalien wurden von den Firmen Riedel-de Haen, Roth, Sigma, Merck, Fluka, Serva und Duchefa bezogen.

**Tab. 4-5: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Matrices**

<b>Hersteller</b>		<b>Chemikalien</b>
ABCR		Benzamidoxim
Aldrich		L-Cystein, Natriumsulfid, Indol-3-Carboxaldehyd,
Duchefa		DTT, IPTG, Tris,
Fluka		KCN, Benzamidin
Merck		Imidazol, Ascorbinsäure
Roth		Acrylamid/Bisacrylamid (30%), Triton X 100, Ammoniumacetat
Serva		Agarose
Sigma		1,5-I-AEDANS, MTT, Hypoxanthin, DTNB, Natriummolybdat
<b>Enzyme</b>		
Biozyme		Xanthinoxidase
Peqlab/Promega		Taq-Polymerase, Restriktionsenzyme
Peqlab		Pwo-DNA-Polymerase
Roche		Alkalische Phosphatase
<b>Matrices</b>		
GE Healthcare		Q-Sepharose, Source Q15
Pharmacia		Superdex 200
Qiagen		Nickel-NTA-Agarose

**4.1.6 Geräte, Material und Software****Tab. 4-6: Verwendete Materialien und Geräte**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
ABI-Prism™-Big-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction Kits	(Perkin Elmer) Applied Biosystems
EasyPure DNA Purification Kit	Biozym
Nick-Säulchen	Amersham Bioscience
\$Nucleo-Spin-Extract-Kits	Macherey und Nagel
Nucleo-Spin-Plasmid-Kits	Macherey und Nagel
ODS Hypersil 120 A Säule	Techlab
PD10-Säulen	Amersham Bioscience
PVDF-Transfer-Membran (Hybond P)	Amersham Bioscience
Q-Sepharose	Amersham Bioscience
Superdex 200 HighLoad 16/60 prep grade	Pharmacia biotech
Superdex 200 HR 10/30 analytical grade	Pharmacia biotech
VivaSpin-Konzentratoren	VivaScience
<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
ABI Prism TM 310 cycle sequencer	PE Applied Biosystems
Äkta Basic 10 System	Amersham
AR-36L Arabidopsis growth chamber	Percival Scientific
Autoklav	Westima Sauter
Fotoeinheit	Intas Mitsubishi
French Pressure Cell Press	Aminco
GC-14 Gaschromatographen	Shimadzu
GenAmp PCR-System 2400	Perkin Elmer
Heizblock Thermostat plus	Eppendorf
HP Series 1100-HPLC	Agilent
Immunoblot-Transfergerät	Micro Bio Tec Brand
Miniblotter-Apparatur	Biometra
PCR-Express Gradient Cycler	Hybaid
Proteingelelektrophorese SE250	Hoefer
Schüttelinkubator Unitron	Infors
Spektrometer UV/Vis Ultrospec 2100 pro	Pharmacia Biotech
Sterilwerkbank LaminAir	Heraeus
Suprafuge 22	Heraeus
Ultraschall-Gerät Sonifier	Branson
Zentrifugen	Sigma, Heraeus, Hettich

**Tab. 4-7: Verwendete Software**

Software	Hersteller
ChemStation for LC 3D	Agilent
Swift II	Pharmacia Biotech
Unicorn 5.01	Amersham
ImageJ 1.38	NIH ( <a href="http://rsb.info.nih.gov/ij/">http://rsb.info.nih.gov/ij/</a> )

## 4.2 Molekularbiologisches Arbeiten

### 4.2.1 Klonierungen

Die in dieser Arbeit durchgeführten DNA-Arbeiten hatten die Subklonierung bzw. Umklonierung von DNA-Fragmenten auf Plasmid-Ebene zum Ziel. Hierdurch sollten Expressionskonstrukte für die rekombinante Expression in *E. coli* und *P. pastoris* erzeugt werden. Die Lagerung und Vermehrung der verwendeten Plasmide erfolgte in dem *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$ . Die mittelfristige Lagerung der Klone erfolgte auf LB-Agar-Platten, zur langfristigen Lagerung von erzeugten Plasmid-Konstrukten wurden diese ebenfalls in den Stamm DH5 $\alpha$  transformiert und in Form von Glycerol-Kulturen bei -70 °C eingefroren. Zur Herstellung von Expressionskonstrukten wurden Restriktions-Endonukleasen, T4-DNA-Ligase und Alkalische Phosphatase entsprechend der Herstellerangaben oder nach Sambrook *et al.* (1989) verwendet. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Nucleo-Spin-Plasmid-Kits von Macherey und Nagel. PCR-Produkte oder andere DNA-Fragmenten wurden in 1 %igen Agarosegelen mit 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) aufgetrennt und DNA-Banden von Interesse wurden unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Elution und Aufreinigung der im Gel enthaltenen DNA erfolgte mit Hilfe des Nucleo-Spin-Extract-Kits von Macherey und Nagel oder dem EasyPure DNA Purification Kit von Biozym. Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Transformation erfolgte ebenfalls nach Sambrook *et al.* (1989).

### 4.2.2 RNA-Isolation

Zum Schutz der RNA vor RNasen, wurden Arbeitsflächen, Pipetten etc. mit Natriumhypochlorid gereinigt, ausschließlich RNase-freie Pipettenspitzen sowie Reaktionsgefäße verwendet und die RNA über den gesamten Arbeitszeitraum in einem gekühlten Zustand gehalten. Die Isolation der RNA erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA Plant

Kit von Macherey und Nagel entsprechend den Herstellerangaben. Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA wurden 5 µl RNA-Lösung in 1 ml ddH<sub>2</sub>O photometrisch bei 230 nm, 260 nm und 280 nm vermessen, wobei die Absorption bei 260 nm die RNA, und die Absorption bei 230 nm bzw. 280 nm Verunreinigungen durch Polysaccharide bzw. DNA erfasst. In hochreinen RNA-Lösungen liegt ein Verhältnis bei 230 nm, 260 nm und 280 nm von etwa 1:2:1 vor. Die Konzentration der RNA konnte über die OD<sub>260</sub> bestimmt werden.

#### **4.2.3 RT-Reaktion**

Die RT-Reaktion wird genutzt, um mittels der Reversen Transkriptase, in Gegenwart eines Oligo-dT-Primers, Gesamt-mRNA in einzelsträngige cDNA umzuschreiben. Die gewünschte cDNA kann aus der gesamten erhaltenen cDNA in einer nachfolgenden PCR, der RT-PCR, mittels spezifischer Primer amplifiziert werden. Nachfolgend liegt die intronfreie Sequenz der gewünschten mRNA, repräsentiert durch den amplifizierten und nun doppelsträngigen cDNA-Abschnitt vor. Zum Schutz der mRNA vor RNasen müssen die unter 4.2.2 beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden.

Für die RT-Standardreaktion wurden jeweils 4-6 µg der Gesamt-RNA eingesetzt und mit RNase freiem H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Nach einer Denaturierung für 3 min bei 65 °C wurde für einen 20 µl-Ansatz folgendes hinzugefügt: 4,0 µl 5x AMV-Puffer (Promega), 4,0 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl Rnase-Inhibitor (rRNasin<sup>®</sup>, 40 U/µl; Promega), 0,5 µl Oligo-dT Primer (100 pmol/µl), 1,0 µl AMV-Reverse Transkriptase (10 U/µl).

Die RT-Reaktion fand für 2 h bei 41 °C statt und wurde durch Auffüllen auf ein Gesamtvolumen von 250 µl mit TE-Puffer abgestoppt.

#### **4.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Verschiedene Variationen der PCR wurden in Abhängigkeit davon verwendet, welcher Anspruch an die Genauigkeit und Prozessivität der verwendeten Polymerase gestellt wurde. Alle Ansätze entsprachen jedoch den Grundsätzen der Standardprotokolle nach Sambrook *et al.* (1989). Bei Ansätzen mit hoher Genauigkeit wurde die mit einer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität ausgestattete Pwo-DNA-Polymerase (Pqqlab) verwendet. Bei geringeren Ansprüchen an die Genauigkeit wurde die Taq-Polymerase (Pqqlab, Promega) eingesetzt. Für alle PCR-Ansätze wurden die Geräte Gen Amp PCR-System 2400 von Perkin Elmer sowie PCR-Express Gradient von Hybaid eingesetzt.



#### **4.2.4.1 Klonierungs-PCR**

Um für die Erstellung von Expressionskonstrukten neue Restriktions-Schnittstellen an definierten Positionen in einer cDNA zu erzeugen, müssen diese unter Verwendung mutagenisierter Primer in die cDNA eingefügt werden. Der erste Schritt zur Modifizierung der cDNA war das Design von Primern, die die gewünschten Basenaustausche enthalten aber weiterhin über eine ausreichende Sequenzhomologie verfügen, um an die Template-DNA spezifisch zu binden. Ein PCR-Ansatz setzte sich in einem Gesamtvolumen von 50 µl aus 1 µM jedes Primers, 200 mM jedes Nucleotids, 20-50 ng Template-DNA, 2,5 U Pwo-DNA-Polymerase und MgCl<sub>2</sub>-enthaltendem Reaktionspuffer zusammen. Die Amplifikation erfolgte unter variierenden Bedingungen in Abhängigkeit von der eingesetzten cDNA. Das Standardprotokoll für die PCR-Ansätze sah einen einmaligen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 2 min vor. Die eigentliche Amplifikation erfolgte in 18-20 Zyklen bestehend aus Denaturierungsschritt (95 °C, 30 s), Annealingschritt (56 °C, 30 s) und einem Elongationsschritt (72 °C, 1 min/kb Template-DNA). Um eine vollständige Auffüllung der synthetisierten DNA-Stränge zu gewährleisten, erfolgte eine Endsynthese für 7 min bei 72 °C.

#### **4.2.4.2 Fusions-PCR**

Um gerichtete Mutationen in eine cDNA einfügen zu können oder um bestehende Mutationen aus einer Sequenz zu eliminieren, wurde in dieser Arbeit die Fusions-PCR genutzt. Die häufigste Anwendung fand sie bei der Erzeugung von Mutationen, um nachfolgend die gewünschte Protein-Variante exprimieren zu können. Die Fusions-PCR besteht aus zwei grundlegenden Einzel-Schritten. Im ersten Schritt werden durch PCR Fragmente der gewünschten cDNA erzeugt, die sich in einem etwa 10-30 bp langen Bereich überlappen. Im zweiten Schritt werden diese Fragmente dann ebenfalls über PCR fusioniert, so dass die vollständige cDNA erhalten wird. Im Falle einer Mutagenese-PCR enthält der überlappende Bereich die gewünschte Mutation. Hierzu wurden zueinander komplementäre Primer erzeugt, die die erforderlichen Basenaustausche enthalten. Die Primer wurden in der ersten PCR als 5'-Primer des einen und als 3'-Primer des anderen Fragmentes eingesetzt, so dass gewährleistet war, dass beide DNA-Stränge die Mutation aufweisen.

Nach der Synthese der Fragmente wurde die eigentliche Fusions-PCR gestartet. Nach einem Denaturierungsschritt gefolgt von der Annealingphase lagern sich die komplementären Abschnitte der Fragmente aneinander. In Anwesenheit von Nukleotiden und Pwo-Polymerase erfolgte die Auffüllung der DNA-Einzelstränge zum Doppelstrang. Die nachfolgende Zugabe endständiger Primer und weitere PCR-Zyklen führten schließlich zur Amplifikation der

vollständigen cDNA. Dabei wurden etwa 20-30 ng der Teilfragmente in Anwesenheit von 2,5 U Pwo-Polymerase und je 200 ng dNTP bei 94 °C für 2 min denaturiert. Daraufhin folgten fünf Zyklen, die aus einem Denaturierungsschritt bei 94 °C von je 30 s, einem 30 s Annealingschritt bei 56 °C und der Elongation bei 72 °C für 1 min/kb DNA bestanden. Die endständigen Primer wurden anschließend jeweils in einer Konzentration von 1 µM zugegeben. Das Programm durchlief nun zusätzliche 15 Mal den oben beschriebenen Zyklus gefolgt von einer abschließenden Endsynthese von 7 min bei 72 °C.

#### **4.2.5 DNA-Sequenzierung**

Für die Sequenzierung wurde stets hochreine DNA eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte im Fall von Plasmid-DNA mit Hilfe des Nucleo-Spin-Plasmid-Kits (Macherey & Nagel), im Fall von PCR-Amplifikat mit dem Nucleo-Spin-Extract-Kit (Macherey & Nagel). Die Sequenzierung selbst erfolgte unter Verwendung von fluoreszenz-markierten ddNTPs des ABI-Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer) mit einem Pop 6 Polymer auf einem ABI Prism™ 310 cycle sequencer (PE Applied Biosystems). Mit einem Teil der Sequenzierungen wurde die Firma MWG beauftragt. Dazu wurden 2 µg reine DNA getrocknet und als Pellet versendet. Die Primer wurden, wenn es sich um eigene Primer handelte, als 10 mM Gebrauchslösung mitverschickt. Die Sequenzierdaten wurden dann durch MWG über das Internet verfügbar gemacht.

#### **4.3 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana***

Die in dieser Arbeit verwendeten *aba3*-Mutanten *aba3-1*, *aba3-2* und *13-5* wurden freundlicherweise durch Annie Marion-Poll vom „Institut National de la Recherche Agronomique“ (INRA) für die Arbeiten von Florian Bittner zur Verfügung gestellt und standen somit auch für diese Arbeit zur Verfügung. Die *aba3*-Mutante *sir3-3* wurde durch Prof. Yunde Zhao von der University of California at San Diego bereitgestellt. Die korrespondierenden Wildtypen Columbia (Col-0), Landsberg erecta (Le) sowie Wassilewskija (Ws) lagen ebenfalls bereits vor.

### 4.3.1 Pflanzenanzucht

Aussaaterde (z.B. Compo) wurde in kleine Pflanztöpfe (7 x 7 x 8cm) verbracht und sehr gut durchnässt. Diese Erde wurde mit ca. 100 Pflanzensamen bestreut. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Töpfe mit Frischhaltefolie abgedeckt oder in ein Mini-Gewächshaus gestellt. Nach einer ein- bis zweitägigen Keimungsinduktion bei 4 °C wurden die Samen in einen Kulturschrank mit definierten Kulturbedingungen überführt. Für diese Arbeit wurde ein AR-36L *Arabidopsis* growth chamber (Percival Scientific) verwendet. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte zunächst für ca. 2 Wochen unter Langtagbedingungen. Darunter versteht man 16 h Lichtphase bei 22 °C und 8 h Dunkelphase bei 20 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60 %. Nach Ausbildung einer kräftigen Rosette wurden die Bedingungen auf Kurztag umgestellt, was eine Verkürzung der Lichtphase auf 9 h bei 22 °C und eine Verlängerung der Dunkelphase auf 15 h bei 20 °C beinhaltete. Die Luftfeuchtigkeit wurde beibehalten. Damit beabsichtigte man eine Verzögerung der Blütenbildung. *A. thaliana* ist eine Langtagpflanze, was sich hinsichtlich der Blühinduktion auswirkt. Unter Langtagbedingungen wird ab dem 20. Tag die Blütenbildung eingeleitet, die unter Kurztagbedingungen jedoch unterdrückt wird. Die Pflanze bekam so die Möglichkeit, länger vegetativ zu wachsen und eine kräftige Rosette auszubilden. Für die parallele Anzucht von Mutanten traten jedoch Probleme auf. Die *aba3*-Mutanten weisen aufgrund des Abscisinsäure-Mangels eine gestörte Stomataregulation auf und treten 5 bis 10 Tage früher in die Blühphase ein. Um dem entgegenzuwirken, wurden die Mutanten während des Wachstums über einen möglichst langen Zeitraum einer höheren Luftfeuchtigkeit (ca. 70-80%) ausgesetzt.

### 4.3.2 Ernte und Verarbeitung des Pflanzenmaterials

Um Pflanzenrohextrakte herzustellen, wurden die geernteten *Arabidopsis*-Pflanzen zunächst von allen Erdresten gereinigt. Zur Lagerung konnten sowohl die vollständigen Pflanzen als auch die Pflanzenrohextrakte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -70 °C eingefroren werden. Zur Herstellung der Rohextrakte wurde das Pflanzenmaterial direkt in flüssigem Stickstoff oder in 1-2 Volumen Extraktionspuffer (0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,2; 2,5 mM EDTA; 5 mM DTT) gemörsernt. Bei Bedarf wurde in diesem Puffer ein zweites Mal gemörsernt, bis eine homogene Masse entstand. Dieses Material wurde bei 11000 x g zentrifugiert und der Überstand entweder frisch verarbeitet oder wie oben beschrieben gelagert.

## 4.4 Proteinbiochemische Arbeiten

### 4.4.1 Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Expressionsbedingungen für die hergestellten Konstrukte variierten in Abhängigkeit von der angestrebten Proteinausbeute bzw. Reinheit sowie der Saturierung mit Cofaktoren. Hierzu wurden der *E. coli*-Expressionsstamm, die Temperatur, die IPTG-Konzentration, die Expressionszeit sowie die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff variiert. Im Standard-Expressionsprotokoll wurde der *E. coli*-Stamm TP1000 und das Expressionsplasmid pQE80 verwendet. Dieses Plasmid vermittelt den Zellen eine Ampicillin-Resistenz. Zudem wird dem exprimierten Protein NH<sub>2</sub>-terminal ein aus sechs Histidinresten bestehender Tag (His-Tag) angehängt, so dass eine spätere Proteinaufreinigung über Affinitätschromatographie ermöglicht wird.

Für die Expression wurden zunächst 5 ml ÜN-Kulturen (LB mit 40 µg/ml Ampicillin) in Reagenzgläsern angesetzt, indem mit einer Impföse frisch transformierte *E. coli*-Klone angeimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert wurden. Hiermit wurden in einer Verdünnung von 1:1000 bis zu 6 L der Hauptexpressionskultur, die auf 2- und 3-L-Kolben verteilt wurden, angeimpft und unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,1 wachsen gelassen. Die Induktion erfolgte mit 15 µM IPTG. Zusätzlich wurde 1 mM Natriummolybdat dem Medium zugesetzt, insofern eine hohe Cofaktorsättigung gewünscht wurde. Die Expression erfolgte anschließend unter Schütteln über einen Zeitraum von 20 h bei einer Temperatur von 22 °C. Bei der Expression in den *E. coli*-Stämmen RK5204 und RK5206 erfolgte auch die Anzucht der ÜN-Kultur bei 22 °C. Auf eine Zugabe von Molybdat wurde hier verzichtet.

Zur Aufarbeitung der Expressionskulturen wurden die Zellen bei 12000 x g für 5 min bei 4°C pelletiert. Die Zellpellets wurden anschließend in 1-2 Volumen Lysispuffer (50 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 % Glycerol; 10 mM Imidazol) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels der French Pressure Cell Press. Bei einem Druck von 1000 psi werden die Zellen durch ein enges Ventil gepresst. Durch die dabei auftretenden Scherkräfte brechen sie auf und der Zellsaft wird freigesetzt. Dieser Schritt wurde zwei- bis dreimal wiederholt. Um den erhaltenen Extrakt weiter zu homogenisieren, erfolgte ein 5-minütiger Sonifizierungsschritt. Die anschließende Zentrifugation bei 40.000 x g für 30 min bei 4 °C separierte die Zelltrümmer von dem Zellsaft. Das so erhaltene Zelllysate konnte für die Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine eingesetzt werden.

#### 4.4.2 Überexpression rekombinanter Proteine in *P. pastoris*

Da die Expression einiger eukaryotischer Proteine eine posttranslationale Modifikation erfordert, die in einem prokaryotischen System wie *E. coli* nicht gewährleistet werden kann, erfordert die rekombinante Expression dieser Proteine die Nutzung eines eukaryotischen Systems. Die einzellige Hefe *P. pastoris* zeichnet sich wegen der kurzen Generationszeit und der leichten Kultivierbarkeit aus. Zudem verfügt dieser Organismus über alle nötigen Mechanismen und das passende Milieu, um die Eukaryonten-spezifische posttranslationale Modifikation des exprimierten Proteins vorzunehmen.

*P. pastoris* ist in der Lage, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Das Methanol wird von zwei Isoformen des Enzyms Alkohol-Oxidase (AOX1 und AOX2) unter Sauerstoffverbrauch zu Formaldehyd oxidiert. Da bei dieser Reaktion als Nebenprodukt  $H_2O_2$  entsteht, findet sie in den Peroxisomen statt. Wenn Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, kommt es zu einer drastischen Verstärkung der Expression der involvierten Enzyme. Die AOX1 repräsentiert unter diesen Bedingungen bis zu 30% der gesamten löslichen Proteinfraction, was einen starken, durch Methanol induzierbaren Promotor voraussetzt. Diesen gezielt induzierbaren Promotor macht man sich für die Fremdgenexpression in *P. pastoris* zunutze. Basierend auf diesem Promotor wird das pPICZ-Vektor-System von Invitrogen genutzt. Der Vektor vermittelt beiden Organismen eine Zeocin<sup>TM</sup>(Invitrogen)-Resistenz, wodurch die Selektion ermöglicht wird. Zudem erhält das exprimierte Protein C-terminal einen His-Tag, wodurch es später affinitätschromatographisch aufgereinigt werden kann. Der Vektor selbst kann nur in *E. coli* repliziert werden. Für die Vervielfältigung der DNA in *P. pastoris* muss diese zunächst in das Genom integriert werden. Um diese stabile Integration zu erreichen, muss die DNA zuerst im Bereich des AOX1-Promotors linearisiert werden. Nach Transformation von *P. pastoris* mit dieser DNA kommt es in der Regel durch homologe Rekombination mit einem single-cross-over zu einer Integration der rekombinanten DNA im 5'-Bereich des AOX1-Gens.

Zur Expression der Aldehydoxidase *AAO1* aus *A. thaliana*, welche als Homodimer die  $AO\alpha$  bildet, wurde ein *P. pastoris*-Stamm verwendet, der von Tomokazu Koshiba von der Tokyo Metropolitan University in Japan zur Verfügung gestellt wurde. Beschrieben wurde dieser Stamm detailliert durch Koiwai *et al.* (2000). Es handelt sich dabei um den Mut<sup>S</sup> (Methanol utilisation slow)-Stamm KM71 (Invitrogen), der mit pPICZ-*AAO1* transformiert wurde. Da in diesem Stamm das *AOX1*-Gen durch eine Insertion zerstört ist, kann nur noch die AOX2-Isoform Methanol metabolisieren, was in einem deutlich verlangsamten Wachstum resultiert.

#### 4.4.2.1 Überexpression der A0α aus *A. thaliana* in *P. pastoris*

Nur die anfängliche Vermehrung der Kolonien von *P. pastoris* findet auf Glucose-haltigem Medium (YPD-Platten) statt. Alle folgenden Flüssigkulturen vor Induktion mit Methanol enthalten ausschließlich Glycerol als Kohlenstoffquelle. Dadurch kommt es zu einer Derepression des *AOX1*-Promotors. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte werden die Zellen zur Induktion in ein Methanol-haltiges Minimalmedium überführt. Da die Metabolisierung des Methanols Sauerstoff erfordert, werden die Kulturen daher ab diesem Zeitpunkt in Schikanekolben geschüttelt und lediglich mit Gaze verschlossen.

YPD-Medium:

20 g/l	Pepton
10 g/l	Hefe-Extrakt
pH 5,8 einstellen, auf 950 ml auffüllen und autoklavieren	
Festmedium enthält 1,5 % Agarose	
50 ml	40 %ige Glucose (sterilfiltriert)

zugeben

BMGY-Medium: 20 g/l Pepton  
10 g/l Hefe-Extrakt  
autoklavieren und folgendes steril zugeben:  
100 ml/l 1 M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,0  
100 ml/l 10 x YNB  
2 ml/l 500 x Biotin  
100 ml/l 10 x Glycerol

BMMY-Medium: wie BMGY, aber statt 10 x Glycerol werden 5 ml/l Methanol und 0,3 mM Natriummolybdat zugegeben

#### 4.4.2.2 Proteinextraktion aus *P. pastoris*

Da mit dem standardmäßigen Zellaufschluss mittels French Press für das *Pichia*-Zellmaterial nicht immer ein befriedigendes Ergebnis erzielt werden konnte, wurde hier eine alternative Aufschlusstechnik unter Verwendung von säuregewaschenen Glasperlen (Sigma) genutzt. Die Zellpellets wurden sowohl mit einem Volumen dieser Glasperlen als auch mit einem Volumen Lysisbuffer (50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,5; 1 mM EDTA; 5% Glycerol) versetzt. Diese Suspension wurde über 30 min in Intervallen von 30 s abwechselnd gevortext und auf Eis gekühlt. Die Abtrennung der Glasperlen erfolgte über einen Zentrifugationsschritt bei 4000 x g für 5 min bei 4°C. Die Überstände wurden bei 40000 x g für 30 min bei 4°C erneut zentrifugiert. Das klare Lysat konnte dann für die Proteinaufreinigung über Ni-NTA-Matrix verwendet werden.

#### **4.4.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-getaggen Proteinen**

Zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mit einem His-Tag macht man sich die hochaffinen Wechselwirkungen zwischen Nickel(Ni)-Ionen und Polyhistidinen an einer Nitrilo-tri-Acetat- (NTA-) Matrix (Qiagen) zu Nutze. Die Ni-Ionen werden von der NTA-Matrix komplexiert und dadurch immobilisiert. In dieser Arbeit wurden die rekombinant exprimierten Proteine im sogenannten Batch-Verfahren aufgereinigt. Hierzu wurde das nach Zentrifugation erhaltene Zelllysate je nach Ausgangsmenge mit 1-3 ml mit Lysispuffer äquilibrierter Ni-NTA-Superflow-Matrix (Kapazität 10 mg/ml) versetzt und bei 4 °C für einen Zeitraum von 1 h bis ÜN geschwenkt, so dass die Proteine mit His-Tag gleichmäßig an die Matrix binden konnten. Anschließend wurde das Gemisch in eine leere mit einer Fritte verschlossene Tropfsäule gefüllt, so dass die Flüssigkeit nach unten abtropfen kann und die Matrix zurückbleibt. Vor dem Waschschrift wurde eine Top-Fritte auf die Matrix gelegt, um ein Aufwirbeln der Matrix zu vermeiden. Das Waschen der Matrix erfolgte mit mindestens drei Volumen Waschpuffer (50 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 6,0; 300 mM NaCl; 10% Glycerol; 20 mM Imidazol) und die Elution des rekombinant exprimierten Proteins durch die Zugabe von Elutionspuffer (50 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 6,0; 300 mM NaCl; 10% Glycerol; 500 mM Imidazol). Bei der Aufreinigung farbloser Proteine wurde die Elution fraktioniert in 500 µl-Schritten durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen anschließend über SDS-PAGE überprüft. Bei der Aufreinigung durch Chromophore gefärbter Proteine erfolgte die Elution anhand der Färbung tropfenweise, um das erforderliche Elutionsvolumen zu minimieren. Die Reinheit der Proteine wurde ebenfalls über SDS-PAGE kontrolliert.

#### **4.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die in dieser Arbeit gewählte Standardmethode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen war der Assay nach Bradford (1976) unter Verwendung von BSA (Rinderserum-Albumin Fraktion V) als Standard. Die Bradford-Stammlösung (Biorad) wurde vorbereitend im Verhältnis 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und über einen Faltenfilter filtriert. Um im linearen Messbereich des Photometers zu bleiben, konnten maximal 20 µg Protein in 1 ml der Bradfordlösung verdünnt werden. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Absorptionsbestimmung bei 595 nm gegen eine Protein-freie Kontrolle.

#### **4.4.5 Konzentrierung von Proteinlösungen**

Die Erhöhung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe von Zentrifugations-Konzentratoren mit einer molekularen Ausschlussgröße (MWCO) von 10-100 kDa in Abhängigkeit von der Proteingröße. Für diese Arbeit wurden VivaSpin-Konzentratoren des Herstellers VivaScience mit einem Probenvolumen von 500 µl bis 15 ml eingesetzt.

#### **4.4.6 Umpuffern von Proteinlösungen**

Um unerwünschte niedermolekulare Bestandteile einer Proteinlösung zu entfernen oder den Proteinpuffer zu wechseln, wurden in dieser Arbeit Nick-Säulchen bzw. PD10-Säulen von Amersham verwendet. Diese Säulchen enthalten eine Gelfiltrationsmatrix, so dass niedermolekulare Substanzen retardiert werden und das Protein früher eluiert. Die Säulen wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

#### **4.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes wurden diskontinuierliche Tris/Glycin-SDS-Gelelektrophorese-Systeme von 7,5 % bis 12 % nach Laemmli (1970) angewendet. Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden dazu vor der Gelelektrophorese mit denaturierendem SDS-PAGE-Ladepuffer (50 % Glycerol; 3,5 % SDS; 15 %  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,02 % Bromphenolblau) versetzt und bei Bedarf bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die Auftrennung erfolgte unter Wasserkühlung bei 120 bis 200 V, bis die Bromphenolblau-Front die untere Kante des Gels erreichte.

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde das Gel in einer Coomassie-Färbelösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 0,15 % Coomassie (w/v)) gefärbt. Nach ca. 1 h wird die Hintergrundfärbung des Gels durch Waschen mit einer 40 %igen Ethanollösung entfernt und die Proteinbanden treten deutlich blau hervor.

#### **4.4.8 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)**

Manche Versuchsansätze machten es nötig, Proteine in ihrer nativen Konformation im Gel voneinander zu separieren. Hierzu wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die Proteine ihre native Konformation beibehalten. Dazu wurde ein nativer Ladepuffer (2 M Saccharose; 0,02 % Bromphenolblau) verwendet, um die Proben zu beschweren und so das Beladen des Gels zu ermöglichen. Das Gel selber enthielt weder SDS noch EDTA. Daher wird die Auftrennung der Proteine im Gel sowohl durch ihre Größe als



auch durch ihre Eigenladung bestimmt. Diese ist dabei in starkem Maße vom pH-Wert des Trenngels abhängig. Diese Methode wurde verwendet, wenn später die Aktivität des nativen Proteins im Gel bestimmt werden sollte.

#### **4.4.9 Gelfiltration**

Bei der Gelfiltration werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Gelfiltration wurde in dieser Arbeit sowohl zur Aufreinigung von Proteinen als auch zur Separierung von ABA3-CT von ABA3-NifS genutzt. Es wurde für präparative Zwecke eine Superdex 200 16/60 prep grade-Säule, für analytische Zwecke eine Superdex 200 10/30 analytical grade-Säule (beide Amersham Pharmacia) verwendet. Die prep-grade-Säule wurde nach Äquilibration mit dem zu nutzenden Puffer mit maximal 2 ml Probe beladen (0,5-5 mg Protein) und bei einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt, die analytische Säule wurde bei gleichen Flussraten mit maximal 200 µl Probe beladen. Als Puffer wurde für ABA3-CT und ABA3-NifS ein 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,2 mit 50 bis 500 mM NaCl bzw. für HMCS-CT ein 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 mit 300 mM NaCl verwendet. Durchgeführt wurden die Gelfiltrationsläufe mit einem Äkta Basic 10 System. Die Versuche wurden sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4 °C durchgeführt.

#### **4.4.10 Anionenaustauscher-Chromatographie**

Bei dieser Methode wird die Eigenschaft des Säulenmaterials, negative geladene Teilchen zu binden, genutzt. In dieser Arbeit wurde eine selbstgepackte SourceQ 15-Säule (Amersham) mit einem Volumen von ca. 10 ml genutzt.

In Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffers haben Proteine positiv oder negativ geladene Reste. Der pH-Wert des für die Anionenaustauscherchromatographie genutzten Puffers wird daher so eingestellt, dass das Protein von Interesse eine negative Nettoladung aufweist. In Anwesenheit eines negativ geladenen Kompetitor-Ions oder durch Variation des pH-Wertes können die an die Matrix gebundenen Moleküle wieder eluiert werden. Diese Elution erfolgte in dieser Arbeit über das Anlegen eines NaCl-Gradienten. Dazu wurde ein Niedrigsalz-Puffer (0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 8,5; Puffer A) mit steigenden Mengen eines Hochsalzpuffers (0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 8,5; 1 M NaCl; Puffer B) gemischt.

#### **4.4.11 Immunoblot-Analyse**

Nach der Auftrennung der Proteine über SDS- oder native-PAGE wurden die Gele für ca. 10 min in Transferpuffer (25 mM Tris/HCl; 20% Methanol, pH 10,4) äquiliibriert um die Proteine dann in einem Semi-Dry-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Transfer-Membran (Hybond P, Amersham Bioscience) zu immobilisieren. Hierzu wurden drei Lagen mit Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere luftblasenfrei auf die Anode des Blotters gelegt. Anschließend wurde die zuvor mit 100% Methanol hydrophilisierte und in Transferpuffer äquiliibrierte Membran gefolgt von drei weiteren Lagen Whatman-Papieren aufgelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup>. Nach Waschen des Blots in 1 x TBS-Lösung (10 mM Tris/HCl pH7,5; 150 mM NaCl) wurden die transferierten Proteinbanden reversibel mit einer PonceauS-Lösung (5 % in 1 x TBS) angefärbt und die Markerbanden, sofern vorhanden, mit Bleistift markiert. Das Entfärben der Membran erfolgte durch Waschen in ddH<sub>2</sub>O und TBSTXS (0,1 % BSA; 0,1 % TritonX-100; 0,05 %SDS; in 1 x TBS). Für den immunologischen Nachweis der transferierten Proteine wurde die Membran zunächst für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C mit Blockierungslösung (2 % BSA in 1 x TBS) inkubiert bevor der gewünschte primäre Antikörper in Blockierungslösung verdünnt zugegeben wurde. Der aufgereinigte Erst-Antikörper gegen ABA3-CT wurde 1:7500, die anti-His-Tag Antikörper 1:1000 und die anti-AO und anti-XDH-Antikörper 1:1000 verdünnt. Die Inkubation erfolgte unter Schwenken für ca. 1,5 h bei Raumtemperatur oder ÜN bei 4 °C, bevor ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Antikörper durch dreimaliges 10-minütiges Waschen der Membran in TBSTXS und einmaliges erfolgte Waschen in 0,8 % NaCl entfernt wurden. An einen erneuten 5-minütigen Blockierungsschritt schloss sich die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei RT an. Hierbei wurden anti-Kaninchen-IgG bzw. anti-Maus-IgG Antikörper genutzt, die entweder als Alkalische-Phosphatase (AP)-Konjugat oder als Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Konjugat vorlagen. Nach erneutem Waschen mit TBSTXS und 0,8 % NaCl erfolgte je nach eingesetztem sekundären Antikörper die Nachweisreaktion. Bei AP-gekoppelten sekundären Antikörpern erfolgte die Färbereaktion durch Benetzen der Membran mit ca. 10 ml BCIP/NBT-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,8; 100 mM NaCl; 0,2 mM MgCl<sub>2</sub>) nach Zugabe von 33 µl BCIP/10 ml und 66 µl NBT/10 ml. Durch Ersetzen der Färbelösung durch ddH<sub>2</sub>O wurde die Färbereaktion gestoppt.

Im Fall von HRP-gekoppelten Antikörpern dient H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat, welches in der Detektionslösung (Amersham) enthalten ist. Hier werden die durch Chemilumineszenz übermittelten Signale auf einem Film (Amersham) sichtbar gemacht. Die Membran wird nach Benetzen mit dem Detektionsreagenz in Folie eingeschlagen, bevor ein ECL-Film aufgelegt wird und in einer Entwicklungskassette für die gewünschte Expositionszeit (10 sec. - ca. 3 min) im Dunkeln auf der Membran belassen wird. Anschließend wird der Film für 90 sec in

der Entwicklerlösung geschwenkt bevor er 30 sec mit Wasser gewaschen und für 60 sec in der Fixiererlösung fixiert wird.

#### **4.4.12 Antikörper-Aufreinigung**

Wenn die Qualität der vorhandenen Antikörper-Seren nicht ausreichend ist, um spezifisch und hintergrundfrei das gewünschte Protein zu detektieren, ist eine Aufreinigung des Antikörpers notwendig. Hierzu wurden zunächst 1-2 mg des aufgereinigten Antigens (ABA3-CT) in 10 ml 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,2 verdünnt, auf eine zuvor mit Methanol hydrophilisierte PVDF-Membran gegeben und für ca. 1 h unter Schwenken an die Membran gebunden. Ungebundenes Protein wurde durch einen Waschschrift entfernt und die Membran nachfolgend in die Blockierungslösung (2 % BSA in 1 x TBS) transferiert. Das Blockieren dauerte 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken. Die so präparierte Membran wurde über Nacht bei 4 °C und langsamem Schwenken mit dem Antikörper-Serum inkubiert. Die Membran wurde daraufhin dreimal für 5 min in 10 ml TBSTXS gewaschen, um Serumreste und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Elution des Antikörpers erfolgte durch die Inkubation der Membran mit 0,1 M Glycin/HCl-Puffer pH 2,5 für 30 s. Das so gewonnene Eluat wurde mit 170 µl 0,1 M Tris neutralisiert. Zur langfristigen Lagerung wurden die Antikörper in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### **4.4.13 Bestimmung des cyanolisierbaren Schwefels am Moco**

In diesem Assay erfolgte die Abspaltung des cyanolisierbaren Schwefels am Moco durch eine Cyanid-Behandlung. Das dabei freigesetzte Thiocyanat wird durch das sogenannte „Sörbos-Reagenz“ (10 g  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  und 20 ml von 65 %iger  $\text{HNO}_3$  pro 150 ml) als rötlicher Eisen-Komplex gebunden, der ein Absorptionsmaximum bei 460 nm aufweist und sich somit photometrisch mit Hilfe einer Thiocyanat-Eichgeraden quantifizieren lässt. Im Vorfeld der Cyanid-Behandlung wird die Proteinkonzentration nach Bradford (4.4.4) und der FormA-Gehalt (4.4.17) bestimmt, so dass eine Aussage über die Menge an Thiocyanat pro mol FormA getroffen werden kann und somit Rückschlüsse auf den Sulfurierungsgrad des Cofaktors gezogen werden können.

Zunächst werden 400 µl des Ni-NTA-aufgereinigten Proteins mit 10-20 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) versetzt und ÜN bei 4 °C inkubiert. Hierdurch werden alle eventuell am Protein vorhandenen Persulfide abgespalten, die den Nachweis des terminalen Schwefels verfälschen würde. Nachfolgend erfolgt das Entsalzen und Umpuffern des Proteins über Nick-Säulchen in 0,1 M Tris-Acetat-Puffer pH 8,6. Die Proteinkonzentration

und der FormA-Gehalt wird ermittelt und jeweils 450 µl des umgepufferten Proteins mit 50 µl einer 0,5 M KCN-Lösung ÜN bei 22 °C inkubiert. Die Abtrennung des Thiocyanats vom Protein erfolgt über einen Zentrifugationskonzentrator mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa. Die Thiocyanat-Lösung wird mit 500 µl des Sörbos-Reagenz versetzt und für 1 min inkubiert, wobei der rötliche Eisen-Komplex gebildet wird. Als Referenz dienen 500 µl einer 50 mM KCN-Lösung. Durch zweiminütige Zentrifugation werden eventuelle Rückstände pelletiert bevor die Quantifizierung am Photometer bei 460 nm erfolgt.

#### **4.4.14 AO- und XDH-Aktivitätsassay im nativen Gel**

Die Aktivität von rekombinant exprimierter XDH und AO oder aus Pflanzenextrakten kann durch einen Aktivitätsassay im nativen PA-Gel visualisiert werden. Im Fall von Pflanzenrohextrakt-Proben werden zunächst mindestens 50 mg Pflanzenmaterial mit 50 µl Extraktionspuffer (100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5; 2,5 mM EDTA; 5 mM DTT) versetzt und bei 4 °C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem Dorn zerquetscht. Für entsprechend größere Ansätze erfolgt der Aufschluss in einem Mörser ebenfalls bei 4 °C. Die Zellbestandteile werden bei 15000 x g für 20 min bei 4°C pelletiert und XDH bzw. AO aus dem Überstand durch Ammoniumsulfat-Präzipitation gefällt. Hierzu wird das Ammoniumsulfat in 10 %-Schritten bis zu einer Konzentration von 40 % zum Zelllysate gegeben. Nach einem weiteren 20 min Zentrifugationsschritt bei 15000 x g und 4 °C wird das Pellet in 400 µl Phosphat- bzw. Tris/HCl-Puffer aufgenommen, über ein Nick-Säulchen entsalzt und auf seinen Proteingehalt hin untersucht. Anschließend erfolgt die Auftrennung über native PAGE oder, wenn gewünscht, zunächst die chemische Resulfurierung der Probe (siehe 4.4.16). Für die Analyse im 7,5 %igen nativen Gel werden ca. 50-500 µg Gesamtprotein eingesetzt. Nach der Auftrennung wird das Gel für die AO-Färbung zunächst für 10 min in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 bzw. für die XDH-Färbung in 200 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,5 äquilibriert. Die Aktivitätsfärbung erfolgt anschließend in 10 ml Färbelösung, die neben den entsprechenden Puffern 300 µM Substrat (Indol-3-Carboxaldehyd oder 1-Naphthaldehyd im Fall von AO; Hypoxanthin im Fall von XDH), 100 µM PMS und 400 µM MTT enthält.

#### **4.4.15 Chemische Sulfurierung von *aba3*-Mutanten**

*Aba3*-Mutanten zeichnen sich durch die Inaktivität von AO und XDH aus, die im Fehlen des terminalen Schwefels am Moco der Enzyme begründet liegt. *In vitro* können diese Desulfo-Enzyme durch Dithionit und Sulfid chemisch sulfuriert und somit aktiviert werden. Diese

Aktivierung kann anschließend durch den unter 4.4.14 beschriebenen Aktivitätsassay im nativen PA-Gel nachvollzogen werden. Für die chemische Sulfurierung wird der zu sulfurierende Pflanzenrohextrakt ebenso wie 0,5 M Stammlösungen von Natriumdithionit und Natriumsulfid im Excikator entgast, bevor je 20 µl des Sulfids und des Dithionits unter anaeroben Bedingungen zum Rohextrakt gegeben werden. Anschließend erfolgt eine anaerobe Inkubation für 30 min bei 37 °C. Der nun chemisch sulfurierte Rohextrakt wird über ein Nick-Säulchen entsalzt und anschließend 50-500 µg Gesamtprotein auf das native PA-Gel zur Analyse aufgetragen.

#### **4.4.17                    *Nit-1*-Rekonstitutions-Assay zum Nachweis von Moco/MPT**

Die *nit-1*-Mutante aus *Neurospora crassa* (Sorger & Giles, 1965; Sorger, 1966) weist keine Molybdoenzymaktivität auf. Im Gegensatz zu anderen pleiotropen Mutanten kann sie jedoch eine stabile Apo-Nitratreduktase bilden, die in zellfreien Extrakten durch Zugabe eines externen Moco, bzw. durch Zugabe von MPT und hohen Konzentrationen von Molybdat, funktionell komplementiert werden kann (Ketchum *et al.*, 1970; Nason *et al.*, 1970). Die Aufnahme von inkorporiertem MPT/Moco kann über die Aktivität der rekonstituierten Nitratreduktase bestimmt werden. Über die Molybdataabhängigkeit dieser Rekonstitution kann somit eine qualitative Aussage über das Vorhandensein von Moco und/oder MPT in der verwendeten Cofaktorquelle gemacht werden.

Je Ansatz wurden 0,5-2 µg Ni-NTA-aufgereinigtes Protein zur Freisetzung des Cofaktors hitzedenaturiert und nach Abkühlen mit *nit-1*-Extrakt in einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Zusätzlich enthielt der Ansatz 4 mM reduziertes GSH und, wo gewünscht, 10 mM Molybdat. Die Komplementation erfolgte nach Entgasen der Proben im Exsikkator anaerob für 1 h bei Raumtemperatur oder ÜN bei 4 °C. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,8 µl NADPH und eine nachfolgende 10 minütige Inkubation im Dunkeln. Die Nitratreduktase-Reaktion wurde durch das Zugabe von 10 µl 0,1 M KNO<sub>3</sub> und 20 µl 0,1 mM FAD gestartet und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert, bevor die Reaktion durch eine 5 minütige Hitzedenaturierung bei 95 °C gestoppt wurde. Zum Nachweis des gebildeten Nitrits wurden 100 µl einer SA/NED-Lösung hinzugefügt, wodurch das akkumulierte Nitrit in einen Diazofarbstoff umgewandelt wird, der nach Zentrifugation für 5 min bei 11000 x g bei 540 nm photometrisch quantifiziert werden kann.

#### 4.4.18 MPT-Nachweis über FormA-dephospho

Da sowohl der Moco als auch seine Vorstufe MPT extrem oxidationssensitiv und dadurch chemisch instabil sind, können diese Cofaktoren nicht direkt detektiert werden. Zum Nachweis beider Substanzen wird daher das chemisch stabile Oxidationsprodukt „FormA-dephospho“ gebildet, das durch saure  $I_2/KI$ -Oxidation entsteht (Johnson *et al.*, 1984). FormA kann direkt aus Moco oder MPT generiert werden. Es weist aufgrund des konjugierten heterozyklischen Ringsystems eine starke Fluoreszenz auf und kann so auch in geringen Mengen sensitiv nachgewiesen werden. Die Anregung findet mit 370 nm statt, die Emission wird bei 450 nm gemessen.

Für einen standardmäßigen Ansatz nach Johnson und Rajagopalan (1982) und Johnson *et al.* (1984) werden 5-10 nmol des aufgereinigten Proteins in einem Gesamtvolumen von 400  $\mu$ l 0,1 M Tris/HCl, pH 7,2 mit frisch angesetzter Oxidationslösung (1 %  $I_2$  / 2 % KI in 1 M HCl) versetzt und für 30 min bei 95 °C oder ÜN bei RT oxidiert. Das präzipitierte Protein und andere Niederschläge werden durch 5 min Zentrifugation bei 11.000 x g pelletiert. Der erhaltene Überstand wird mit 56  $\mu$ l einer frisch angesetzten 1 %igen Ascorbinsäure-Lösung versetzt. Durch Zugabe von 200  $\mu$ l 1 M Tris wird der pH-Wert der Lösung auf ca. 8,3 eingestellt und 13  $\mu$ l 1 M  $MgCl_2$  zugesetzt. Anschließend werden dem Ansatz 0,5 U einer Alkalischen Phosphatase zugegeben und für mindestens 2 h bei RT inkubiert, um ein vollständiges Abspalten der terminalen Phosphatgruppe zu gewährleisten. Um FormA-dephospho in reiner Form zu erhalten, erfolgt eine anschließende Aufreinigung über isokratische Anionenaustauscherchromatographie.

Für die Aufreinigung von FormA-dephospho wurde eine starke Anionenaustauscher-Matrix (Q-Sepharose™ Fast Flow, Amersham) genutzt. Das Matrixmaterial wurde in 1 M NaCl ÜN gequollen, mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und etwa 0,5 ml dieses Materials in leere Nick-Säulchen gefüllt. Durch Äquilibrieren mit 1 M Ammoniumacetat wurde die Matrix in die Acetat-Form überführt und anschließend mehrfach mit ddH<sub>2</sub>O gespült und mit einer Fritte abgeschlossen. Vor jedem Aufreinigungsschritt wurden die Säulchen mit 10 ml 1 M Ammoniumacetat und 10 ml ddH<sub>2</sub>O gespült. Nach einem weiteren 5 min Zentrifugationsschritt wurde die Probe auf die Matrix gegeben. Nach vollständigem Einsinken der Probe wurde die Matrix erneut mit 10 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen, bevor die Elution mit 10 mM Essigsäure erfolgte, wobei zunächst ein Totvolumen von 300  $\mu$ l auf die Säule gegeben wurde. Anschließend wurde das gebundene FormA-dephospho mit 800  $\mu$ l Essigsäure eluiert. Zur Untersuchung und Quantifizierung der Q-Sepharose-aufgereinigten FormA-dephospho-Proben werden 50-400  $\mu$ l auf eine HPLC C18 Reverse Phase Column (4,6 \* 250 mm; Hypersil-ODS Particle, 5  $\mu$ m) aufgetragen und bei RT analysiert. Dabei kann die FormA-Menge über die Integration der Peakfläche quantifiziert werden. Verwendet wurde eine HP Series 1100-HPLC (Agilent). Die Elution erfolgte bei einer

Flussrate von 1 ml/min in einem Laufpuffer aus 5 mM Ammoniumacetat und 15 % Methanol. Der FormA-Peak eluierte nach ca. 5-6 ml, was durch Standards mit MPT-Synthase oder Moco-Carrier-Protein bestätigt wurde. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software ChemStation for LC 3D (Agilent).

#### **4.4.19 Nachweis freier Sulfhydrylgruppen durch DTNB**

Sulfhydrylgruppen wurden an ABA3-CT durch die Methode nach Ellman (1959) nachgewiesen. Die Ansätze enthielten 100-150 µM Protein in 0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0; 0,2 M NaCl in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Anzahl der freien Sulfhydryl-Gruppen durch die Bildung des gelben Anions der 5-Thio-2-Benzoessäure bei 412 nm durch eine Cystein-Kalibriergerade quantifiziert.

#### **4.4.20 1,5-I-AEDANS In-Gel-Assay**

1,5-I-AEDANS bindet an Thiolgruppen wie z.B. an frei zugängliche Cysteinreste eines Proteins oder an Thiolgruppen niedermolekularer Substanzen. Es ist unter UV-Licht als fluoreszierende Bande im PA-Gel deutlich zu erkennen. In dieser Arbeit wurde der 1,5-I-AEDANS zum Nachweis frei zugänglicher Sulfhydrylgruppen an ABA3-CT verwendet. Hierzu müssen die Proteinproben zunächst in einen Puffer gebracht werden, der keine der bekannten Reaktionspartner des 1,5-I-AEDANS wie z.B. Imidazol enthält (hier: 0,2 M Tris/HCl pH 7,5). Es folgte die Inkubation von 15 µg Protein mit einer äquimolaren bis zu neunfach molaren Menge an 1,5-I-AEDANS für 1 h bei 4 °C. Nicht gebundenes 1,5-I-AEDANS wird durch die Zugabe von 1 µl 1 mM L-Cystein (in 0,1 M Tris/HCl, pH 9,3) und 30 min Inkubation bei 22 °C abreagiert. Anschließend wird die Probe durch die Zugabe von SDS-Ladepuffer für 1 min bei Raumtemperatur denaturiert und sofort auf ein 12 %iges SDS-PA-Gel aufgetragen und bei 200 V für 1 h aufgetrennt. Zur Visualisierung der Banden wird das PA-Gel UV-Licht ausgesetzt.

#### **4.4.21 Schwefelübertragung zwischen den ABA3-Domänen**

Da die *in vivo*-Situation zeigt, dass ABA3-NifS zwar alleine für die Mobilisierung des Schwefels aus L-Cystein verantwortlich ist, die Übertragung dieses Schwefels auf die Zielproteine AO/XDH aber nur in Abhängigkeit von ABA3-CT erfolgen kann, sollte ein möglicher Schwefeltransfer in Form eines Persulfides von ABA3-NifS auf ABA3-CT gezeigt

werden. Ein solches Persulfid könnte nachfolgend mittels des 1,5-I-AEDANS-Gel-Assays verfolgt werde.

ABA3-CT wurde zunächst für 1 h bei 4 °C mit 10 mM TCEP vorbehandelt, um eventuell gebundene Persulfide abzuspalten und ABA3-NifS wurde mit 0,5 mM L-Cystein für 1 h bei 4 °C inkubiert, um eine vollständige Beladung mit Persulfiden zu erreichen. Überschüssiges L-Cystein wurde anschließend durch Umpuffern über eine Nick-Säule entfernt. Die beiden Domänen wurden nun für 1 h bei 4 °C coinkubiert, bevor sie über einen Gelfiltrationslauf wieder separiert wurden. Dabei kam die Gelfiltrationssäule Superdex 200 Prepgrade 26/60 von GE-Healthcare zum Einsatz. Nach Äquilibrieren der Säule mit 20 mM Tris/HCl-Puffer, 0,3 M NaCl, pH 7,5 bei einer Flussrate von 1ml/min, folgte die Beladung mit dem Proteingemisch, dass zuvor ebenfalls auf eine NaCl-Konzentration von 0,3 M gebracht wurde. Im Anschluss an die Gelfiltration erfolgte der Nachweis des proteingebundenen Persulfids mittels 1,5-I-AEDANS im SDS PA-Gel. Hierzu wurden die Parameter für den Assay so gewählt, dass sich das Reaktionsprodukt aus Persulfid und 1,5-I-AEDANS von anderen auftretenden Reaktionsprodukten trennen und eindeutig im Gel bestimmen lässt. Die nach der Gelfiltration erhaltenen Fraktionen wurden mit 0,5 µl 1 mM 1,5-I-AEDANS für 30 min bei 4 °C inkubiert und nachfolgend nicht gebundenes 1,5-I-AEDANS durch die Zugabe von 1 µl 1 mM L-Cystein abreagiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 12 %igen SDS-PA-Gel, welches durch die Zugabe von 140 µl 4 M NaOH zum Gelmix einen leicht erhöhten pH-Wert hat. Dadurch verbessert sich die Auftrennung der verschiedenen 1,5-I-AEDANS-Reaktionsprodukte.

#### **4.4.22 Moco-Übertragung zwischen den ABA3-Domänen**

Zum Nachweis eines *in vitro*-Transfers von Moco/MPT von ABA3-NifS zu ABA3-CT wurde Moco-freier ABA3-CT, der im *E. coli*-Stamm RK5204 exprimiert wurde zunächst im äquimolaren Verhältnis mit Moco-haltigem ABA3-Nifs für 30 min bei 22 °C in 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,2 coinkubiert, um einen Transfer des Cofaktors zwischen den beiden Domänen zu ermöglichen. Nachfolgend wurde das Proteingemisch auf eine zuvor äquilibrierte Superdex 200 prep grade Gelfiltrationssäule (50 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,2; 200 mM NaCl) gegeben und die Proteine in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Aliquots der erhaltenen Fraktionen wurden über SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft und die Fraktionen, die ausschließlich ABA3-CT enthielten, gepoolt und über FormA-Analyse auf den Cofaktorgehalt hin überprüft.



#### **4.4.23 Aktivierung von AO und XDH durch ABA3-CT/HMCS-CT**

Zum Nachweis einer Aktivitätssteigerung der XDH und der AO durch ABA3-CT bzw. HMCS-CT wurden jeweils 1-2 µg der AO bzw. der XDH mit 2-50 µg ABA3-CT bzw. HMCS-CT für 30 min bei 22 °C coinkubiert und anschließend auf ein 7,5 %iges natives PA-Gel aufgetragen und bei 120 V unter Kühlung aufgetrennt. Als Kontrolle dienten Ansätze, die ausschließlich AO bzw. XDH enthielten. Die Coinkubation erfolgte im Fall von XDH in 0,2 M Tris/HCl-Puffer pH 8,5 und im Fall der AO in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5. Die nachfolgende Aktivitätsfärbung erfolgte wie unter 4.4.15 beschrieben.

#### **4.4.24 Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität für ABA3-CT**

Die Bestimmung der Benzamidoximreduktaseaktivität von ABA3-CT und HMCS-CT erfolgte auf zwei verschiedene Arten. Zum einen wurde die Menge des gebildeten Benzamids nach Umsetzung des Substrates Benzamidoxim über HPLC-Analytik bestimmt. Diese Messungen wurden von Antje Havemeyer an der Universität Kiel durchgeführt. Ein zweiter Nachweis beruhte auf der Messung der Abnahme des Cosubstrates NADH.

Bei der Bestimmung über die gebildete Menge Benzamidin wurde wie folgt vorgegangen: 135 µg des rekombinanten Proteins wurden mit 1 mM NADH in einem Gesamtvolumen von 75 µl in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 bei 37 °C zunächst für 3 min vorinkubiert bevor die Reaktion durch Zugabe von 0,5 mM Benzamidoxim gestartet wurde und für 10 min bei 37 °C unter Schwenken andauerte. Die Proben wurden 5 min geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 x g abgetrennt. Das gebildete Benzamidin wurde durch HPLC-Analytik an einer LiChroCART 250-4 HPLC-Kartusche mit LiChrospher 60 RP-select B (5 µm) in 10 mM 1-Octylsulfonat (in ddH<sub>2</sub>O/Acetonitril 83:17 (v/v)) mit einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Die Retentionszeiten des Benzamids lagen bei 26,6-26,8 min.

Bei der zweiten Methode wurde die Benzamidoximreduktaseaktivität anhand eines Photometer-Assays im UV-VIS-Spektrometer durchgeführt. 500 µg des rekombinanten Wildtyp-Proteins und der Varianten wurden in einem Gesamtvolumen von 500 µl in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit 0,4 mM NADH und 0,5 mM Benzamidoxim zum Reaktionsstart coinkubiert. Die Abnahme des Cosubstrates NADH wurde bei Raumtemperatur anhand der Absorptionsabnahme bei 340 nm über einen Zeitraum von 20 min im Fünfsekundentakt verfolgt, wobei die Bestimmung des umgesetzten NADH anhand einer NADH-Kalibriergeraden erfolgte.

## 5 Zusammenfassung

Molybdoenzyme der Xanthinoxidase-Familie benötigen für ihre Aktivität einen sulfurierten Molybdäncofaktor (Moco). Der hierfür benötigte Schwefel wird in einem posttranslationalen Schritt inseriert, wobei ein Oxo-Ligand am Molybdän gegen einen Schwefel-Liganden ausgetauscht wird. Diese enzymatische Aktivierung erfolgt in *A. thaliana* durch die Moco-Sulfurase ABA3, einem Zwei-Domänen-Protein mit einer NH<sub>2</sub>-terminalen NifS-ähnlichen Domäne (ABA3-NifS), die als L-Cystein-Desulfurase fungiert und einer C-terminalen Domäne (ABA3-CT) mit bislang ungeklärter Funktion. In dieser Arbeit wurde ABA3-CT, und erstmalig auch die C-terminale Domäne der humanen Moco-Sulfurase (HMCS-CT) funktionell und biochemisch analysiert. An beiden separat exprimierten Domänen konnte das spezifische Binden von Moco nachgewiesen werden, wovon zwei Drittel in der von den Zielproteinen Aldehydoxidase und Xanthindehydrogenase benötigten sulfurierten Form vorliegen. In Co-Inkubationsversuchen mit freiem Moco und ABA3-CT konnte ein K<sub>D</sub>-Wert von  $0,55 \pm 0,14 \mu\text{M}$  bestimmt werden, der eine hoch affine Bindung von Moco an ABA3-CT demonstrierte. Die rekombinante Expression von ABA3-CT- und HMCS-CT-Varianten, die in *A. thaliana*-Mutanten bzw. in Xanthinurie Typ II-Patienten natürlich auftretende Mutationen widerspiegeln, zeigten alle eine starke Reduktion bzw. den kompletten Verlust des sulfurierten Moco, was zeigte, dass dieser essentiell für die Funktion der Moco-Sulfurase ist. Basierend auf diesen Erkenntnissen konnte schließlich ein Moco-Bindemotiv in ABA3-CT und HMCS-CT identifiziert werden. Die Co-Inkubation von Aldehydoxidase bzw. Xanthindehydrogenase mit ABA3-CT, beladen mit sulfuriertem Moco, führte zu Überaktivierung derselben, wodurch die Relevanz des ABA3-CT für die Aktivierung der ABA3-Zielproteine untermauert wurde. Mutationen von drei strikt konservierten Cysteinen zeigten einen Einfluss insbesondere des Cysteins 758 in ABA3-CT auf den Sulfurierungsstatus des gebundenen Moco. Da ein Transfer von Schwefel in Form eines Persulfides von ABA3-NifS zu ABA3-CT *in vitro* gezeigt werden konnte, ist als wahrscheinlich anzunehmen, dass dieser Persulfid-Schwefel die Quelle des Schwefels am Moco von ABA3-CT ist.

Als ein zu den C-Termini der Moco-Sulfurasen homologes Protein wurde darüber hinaus das „mitochondrial amidoxime reducing component“-Protein mARC aus der äußeren Membran von Schweinelebermitochondrien identifiziert. mARC reduziert im Komplex mit Cytochrom b<sub>5</sub> und Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase NADH-abhängig *N*-hydroxylierte Amidoxime zu den korrespondierenden Amidinen und stellt *in vivo* möglicherweise ein Detoxifizierungssystem für natürliche Mutagene wie das Basenanalogon 6-*N*-Hydroxyaminopurin dar. Da die *N*-reduktive Aktivität von mARC strikt Moco-abhängig ist, konnte mARC als ein neues eukaryontisches Molybdoenzym klassifiziert werden. Erste Ergebnisse deuteten an, dass auch der Moco an mARC in sulfurierter Form vorliegt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Amrani, L.,** Primus, J., Glatigny, A., Arcangeli, L., Scazzocchio, C. and Finnerty, V. (2000): Comparison of the sequences of the *Aspergillus nidulans* *hxB* and *Drosophila melanogaster* *ma-I* genes with *nifS* from *Azotobacter vinelandii* suggests a mechanism for the insertion of the terminal sulphur atom in the molybdopterin cofactor. *Mol. Microbiol.* **38** (1), 114-125.
- Anantharaman, V. & Aravind, L.** (2002): MOSC domains: ancient, predicted sulfur-carrier domains, present in diverse metal-sulfur cluster biosynthesis proteins including Molybdenum cofactor sulfurases. *FEMS Microbiology Letters* **207**, 55-61.
- Bittner, F.,** Oreb, M. and Mendel, R.R. (2001): ABA3 is a molybdenum cofactor sulfuryase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276** (44), 40381-40384.
- Bogaart, A.M. & Bernini, C.F.** (1981): The molybdoenzyme system of *Drosophila melanogaster*. I. Sulfite oxidase: Identification and properties. Expression of the enzyme in *maroon-like*, (*ma-l*), *low-xanthine dehydrogenase* (*lxd*) and *cinnamon* (*cin*) flies. *Biochem. Genet.* **19**, 929.
- Börner G.,** Karrasch M., Thauer R.K. (1991): Molybdopterin adenine dinucleotide and molybdopterin hypoxanthine dinucleotide in formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *FEBS*, **290**: 31-34.
- Bordas, J.,** Bray. R.C., Garner, C.D., Gutteridge, S. and Hasnain, S.S. (1980): X-ray absorption spectroscopy of xanthine oxidase. The molybdenum centres of the functional and the desulpho forms. *Biochem. J.* **191**, 499-508.
- Bortels, H.** (1930): Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffbindung. *Arch. Mikrobiol.* **1**, 333-342.
- Boyington, J.C.,** Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V., Stadtman, T.C. and Sun, P.D. (1997): Crystal structure of formate dehydrogenase H: Catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine and an Fe4S4 cluster. *Science* **275**, 1305-1308.
- Bradford, M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramme quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Campbell, W.H.** (1999): Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 277-303.
- Clement, B.** (2002): Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxylamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab. Rev.* **34**, 565-579.
- Cohen, H.J.,** Fridovich, I., Rajagopalan, K.V. (1971): Hepatic sulfite oxidase. A functional role for molybdenum. *J. Biol. Chem.* **246**, 374-382.
- Coughlan, M.P.** (1980): Molybdenum and molybdenum containing enzymes. Pergamon Press. Oxford.
- Dai, X.,** Fluhr, R., Nozaki, H., Cheng, Y., and Zhao, Y. (2005): Genetic and chemical analyses of the action mechanisms of sirtionol in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 3129-3134.
- Eilers, T.,** Schwarz, G., Brinkmann, H., Witt, C., Richter, T. (2001): Identification and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase. A new player in plant sulphur metabolism. *J. Biol. Chem.* **276**, 46989-94.

- Ettmayer, P.**, Amidon, G.L., Clement, B., and Testa, B. (2004): Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.* **47**, 2393-2404.
- Finnerty, V. & Johnson, G.** (1979): Post-Translational Modification as a Potential Explanation of High Levels of Enzyme Polymorphism: Xanthine Dehydrogenase and Aldehyde Oxidase in *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics*; **91**(4):695-722.
- Fischer, K.**, Llamas, A., Tejau-Jimenez, M., Schrader, N., Kuper, G., Ataya, F.S., Galvan, A., Mendel, R.R., Fernandez, E., Schwarz, G. (2006): Function and Structure of the Molybdenum cofactor Carrier Protein from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **281** (40), 30186-94.
- Forrest, H.S.**, Glassman, E. and Mitchell, H.K. (1956): Conversion of 2-amino-4-hydroxypteridine to isoxanthopterin in *Drosophila melanogaster*. *Science* **124**, 725-726.
- Forrest, H.S.**, Hanley, E.W. and Lagowski, J.M. (1961): Biochemical differences between the mutants *rosy-2* and *maroon-like* of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **46**, 1455-1463.
- Garret, R.M.** (1996): Site-directed mutagenesis of recombinant sulfite oxidase: identification of cysteine207 as a Ligand of molybdenum: *J. Biol. Chem.* **271** (13), 7387-91.
- Genest O.**, Ilbert M., Méjean V., Iobbi-Nivol C. (2005): TorD, an essential chaperone for TorA molybdoenzyme maturation at high temperature. *J Biol Chem.*; **280**(16):15644-8.
- Gilmour, S.J. & Thomashow, M.F.** (1991): Cold-acclimation and cold-regulated gene expression in ABA-mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1233-1240.
- Glassman, E. & Mitchell, H.K.** (1959): Mutants of *Drosophila Melanogaster* deficient in Xanthine Dehydrogenase. *Genetics.* **44** (2):153-62.
- Gupta, U.C.** (ed) (1997): Molybdenum in Agriculture. Cambridge University Press.
- Gustafsson, D.**, Nystrom, J., Carlsson, S., Bredberg, U., Eriksson, U., Gyzander, E., Elg, M., Antonsson, T., Hoffmann, K., Ungell, A., Sorensen, H., Nagard, S., Abrahamsson, A., and Bylund, R. (2001): The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb. Res.* **101**, 171-181.
- Gutteridge, S.**, Tanner, S.J., Bray R.C., (1978): The molybdenum centre of native xanthine oxidase. Evidence for proton transfer from substrates to the centre and for existence of an anion-binding site. *Biochem J.*; **175**(3):869-78.
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557.
- Hänzelmann, P. & Schindelin, H.**, (2006): Binding of 5'-GTP to the C-terminal FeS cluster of the radical S-adenosylmethionine enzyme MoaA provides insights into its mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **103**(18):6829-34.
- Hauptmann, J.** (2002): Pharmacokinetics of an emerging new class of anticoagulant/antithrombotic drugs. A review of small-molecule thrombin inhibitors. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **57**, 751-758.
- Havemeyer, A.**, Bittner, F., Wollers, S., Mendel, R.R., Kunze, T., and Clement, B. (2006): Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem.* **281**: 34796-802

**Heidenreich, T.**, Wollers, S., Mendel, R.R. & Bittner, F. (2005): Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration. *J Biol Chem* **280**: 4213-4218.

**Heino, P.**, Sandman, G., Lång, V., Nordin, K. and Palva, E.T. (1990): Absciscic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* **79**, 801-806.

**Hille, R.** (1996a): Structure and function of mononuclear molybdenum enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 397-404.

**Hille, R.** (2006): Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase. *Eur. J. Inorg. Chem.* **10**, 1913-1926

**Hoff, T.**, Schnorr, K.M., Meyer, C. and Caboche, M. (1995): Isolation of two *Arabidopsis* cDNAs involved in early steps of molybdenum co-factor biosynthesis by functional complementation of *Escherichia coli* mutants. *J. Biol. Chem.* **270**, 6100-6107.

**Ichida, K.**, Matsumura, T., Sakuma, R., Hosoya, T. and Nishino, T. (2001): Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria type II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 1194-1200.

**Ivanov NV.**, Trani M., Edmondson DE. (2004): High-level expression and characterization of a highly functional Comamonas acidovorans xanthine dehydrogenase in Pseudomonas aeruginosa. *Protein Expr Purif.* **37**(1):72-82.

**Ivanov NV.**, Hubálek F., Trani M., Edmondson DE. (2003): Factors involved in the assembly of a functional molybdopyranopterin center in recombinant Comamonas acidovorans xanthine dehydrogenase. *Eur J Biochem.* **270**(23):4744-54.

**Johnson, DC.** Dean, DR., Smith, AD., Johnson, MK. (2005): Structure, function and formation of biological Iron-Sulfur-Clusters. *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 247-81

**Johnson, J.L.**, Hainline, B.E. and Rajagopalan, K.V. (1980): Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase and nitrate reductase. Identification of a pterin as structural component. *J. Biol. Chem.* **255**, 1783-1786.

**Johnson, J.L. & Rajagopalan, K.V.** (1982): Structural and metabolic relationship between the molybdenum cofactor and urothione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6856-6860.

**Johnson, J.L.**, Hainline, B.E., Rajagopalan, K.V. and Arison, B.H. (1984): The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. *J. Biol. Chem.* **259**, 5414-5422.

**Johnson, M. E., & Rajagopalan, K.V.** (1987a): *In vitro* system for molybdopterin biosynthesis. *J Bacteriol* **169**: 110-116.

**Johnson, M. E., & Rajagopalan, K.V.** (1987b): Involvement of *chlA*, *E*, *M*, and *N* Loci in *E. coli* molybdopterin biosynthesis. *J Bacteriol* **169**: 117-125.

**Johnson, J.L.**, Bastian, N.R. and Rajagopalan, K.V. (1990): Molybdopterin guanine dinucleotide: A modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* forma specialis denitrificans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1390-1394.

**Kessler, D.** (2006): Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* **30** 825-840.

**Ketchum, P.A.**, Cambier, H.Y., Frazier, W.A., Madansky, C.H., & Nason, A. (1970): *In vitro* assembly of *Neurospora* assimilatory nitrate reductase from protein subunits of *Neurospora* mutant and the

xanthine oxidizing and aldehyde oxidase systems of higher animals. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **66**: 1016-1023.

**Kisker, C.**, Schindelin, H. and Rees, D.C. (1997): Molybdenum cofactor containing enzymes: Structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 233-267.

**Koiwai, H.**, Akaba, S., Seo, M., Komano, T., and Koshiba, T. (2000): Functional expression of two *Arabidopsis* aldehyde oxidases in the yeast *Pichia pastoris*. *J. Biochem. (Tokyo)* **127**, 659-664.

**Koshiba, T.**, Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N. and Sato, M. (1996): Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. *Plant Physiol.* **110**, 781-789.

**Kozmin SG**, Pavlov YI, Dunn RL, Schaaper RM. (2000): Hypersensitivity of *Escherichia coli* Delta(uvrB-bio) mutants to 6-hydroxylaminopurine and other base analogs is due to a defect in molybdenum cofactor biosynthesis. *J Bacteriol.* **182**(12):3361-7.

**Kozmin SG**, Schaaper RM. (2007): Molybdenum cofactor-dependent resistance to N-hydroxylated base analogs in *Escherichia coli* is independent of MobA function. *Mutat Res.* **619**(1-2):9-15.

**Kramer, S.P.**, Johnson, J.L., Ribeiro, A., Millington, D.S. and Rajagopalan, K.V. (1987): The structure of the molybdenum cofactor. Characterization of di(carboxamidomethyl)-molybdopterin from sulfite oxidase and xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **262**, 16357-16363.

**Kuper, J.**, Llamas, A., Hecht, H. J., Mendel, R. R., Schwarz, G. (2004): Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* **430**: 803-6.

**Laemmli, K.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of

the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

**Leimkühler, S., & Rajagopalan, K.V.** (2001): A sulfurtransferase is required in the transfer of cysteine sulfur in the *in vitro* synthesis of molybdopterin from precursor Z in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**: 22024-22031.

**Leimkuhler S.**, Hodson R., George GN., Rajagopalan KV. (2003): Recombinant *Rhodobacter capsulatus* xanthine dehydrogenase, a useful model system for the characterization of protein variants leading to xanthinuria I in humans. *J Biol Chem.*; **278**(23):20802-11

**Léon-Kloosterziel, K.M.**, Alvarez Gil, M., Ruijs, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E., Schwartz, S.H., Zeveaart, J.A.D and Koorneef, M. (1996): Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *The Plant Journal* **10** (4), 655-661.

**Leydecker, M.-T.**, Moureaux, T., Kraepiel, Y., Schnorr, K. and Caboche, M. (1995): Molybdenum cofactor mutants, specifically impaired in xanthine dehydrogenase activity and abscisic acid biosynthesis, simultaneously overexpress nitrate reductase. *Plant Physiol.* **107**, 1427-1431.

**Llamas A.**, Mendel R.R., Schwarz G. (2004): Synthesis of adenylated molybdopterin: an essential step for molybdenum insertion. *J. Biol. Chem.* **279**: 55241-55246.

**Llamas, A.**, Otte, T., Multhaup, G., Mendel, RR., Schwarz, G., (2006): The Mechanism of nucleotide-assisted molybdenum insertion into molybdopterin. A novel route toward metal cofactor assembly. *J Biol Chem.*; **281**(27):18343-50. Epub 2006 Apr 24.

**Mahler, H.R.**, Mackler, B. and Green, D.E. (1954): Studies on metallo-flavoproteins.III. Aldehyde oxidase: A

molybdoflavoprotein. *J.Biol. Chem.* **210**, 465-480.

**Malthouse, J.P. & Bray, R.C.** (1980): The nature of the sulphur atom liberated from xanthine oxidase by cyanide. *Biochem J* **191**: 265-267.

**Marin, E. & Marion-Poll, A.** (1997): Tomato *flacca* mutant is impaired in ABA aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase activities. *Plant Physiol. Biochem.* **35** (5), 369-372.

**Massey, V. & Edmondson, D.** (1970): On the Mechanism of Inactivation of Xanthine Oxidase by Cyanide *J Biol Chem* **245**: 6595-6598.

**Mendel, R.R.** (1997): Molybdenum cofactor of higher plants: Biosynthesis and molecular biology. *Planta* **203**:399-405.

**Mendel, R.R. & Bittner F.** (2006): Cell biology of molybdenum. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1763** (7): 621-35.

**Mihara, H.,** Kurihara, T., Yoshimura, T., Soda, K., Esaki, N. (1997): Cysteine sulfinic desulfurase, a NIFS-like protein of *Escherichia coli* with selenocysteine lyase and cysteine desulfurase activities. Gene cloning, purification, and characterization of a novel pyridoxal enzyme. *J Biol Chem.*; **272**(36):22417-24.

**Nason, A.,** Antoine, A.D., Ketchum, P.A., Frazier, W.A. & Lee, D.K. (1970): Formation of assimilatory nitrate reductase by in vitro inter-cistronic complementation in *Neurospora crassa*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **68**: 137-144.

**Nason, A.,** Lee, K.-Y., Pan, S.-S., Ketchum, P.A., Lamberti, A. and De Vries, J. (1971): *In vitro* formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: Nitrate reductase from a *Neurospora* mutant and a component of molybdenum enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 3232-3246.

**Neumann, M.,** Stocklein, W., Leimkühler, S., (2007): Transfer of the molybdenum cofactor synthesized by *Rhodobacter capsulatus* MoeA to XdhC and MobA. *J Biol Chem.* 2007 Aug 7

**Neumann, M.,** Stocklein, W., Walburger, A., Magalon, A., Leimkühler, S., (2007): Identification of a *Rhodobacter capsulatus* l-Cysteine Desulfurase that sulfurates the Molybdenum Cofactor when bound to XdhC and before its insertion into Xanthine Dehydrogenase. *Biochemistry.*; **46**(33):958 6-9595.

**Nguyen, J.** (1986): Plant xanthine dehydrogenase: its distribution, properties and function. *Physiol. Vegetale* **24**, 263-281.

**Nicholas, D.J.D.,** Nason, A. and McElroy, W.D. (1954): Molybdenum and nitrate reductase. I. Effects of molybdenum deficiency on the *Neurospora* enzyme. *J. Biol. Chem.* **207**, 341-451.

**Nicholas, D.J.D. & Nason, A.** (1954): Molybdenum and nitrate reductase. II. Molybdenum as a constituent of nitrate reductase. *J. Biol. Chem.* **207**, 353-361.

**Palmer, T.,** Vasishita, Whitty, W.P. and Boxer, D. (1994): Isolation of protein FA, a product of the *mob* locus required for molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **222**: 687-692.

**Palmer, T.,** Santini, C.L., Iobbi Nivol, C., Eves, D.J., Boxer, D.H. and Giordano, G. (1996): Involvement of *narJ* and *mob* gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**, 875-884.

**Parry, A.D.,** Blonstein, A.D., Babiano, M.J., King, P.J. and Horgan, R. (1991): Absciscic acid metabolism in a wilt mutant of *Nicotiana glauca*. *Plumbaginifolia*. **183**: 237-243.

**Pateman, J.A.**, Cove, D.J., Rever, B.M. and Roberts, D.B. (1964): A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature* **201**, 58-60.

**Pavlov YI**, Noskov VN, Lange EK, Moiseeva EV, Pshenichnov MR, Khromov-Borisov NN. (1991): The genetic activity of N6-hydroxyadenine and 2-amino-N6-hydroxyadenine in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* **253**(1):33-46.

**Peretz, H.**, Naamati, MS., Levartovsky, D., Lagziel, A., Shani, E., Horn, I., Shalev, H., Landau, D. (2007): Identification and characterization of the first mutation (Arg776Cys) in the C-terminal domain of the Human Molybdenum Cofactor Sulfurase (HMCS) associated with type II classical xanthinuria. *Mol Genet Metab.* ;**91**(1):23-9

**Peterlin-Masic, L.**, Cesar, J., and Zega, A. (2006): Metabolism-directed optimisation of antithrombotics: the prodrug principle. *Curr. Pharm. Des.* **12**, 73-91.

**Pienkos, P.T.**, Shah, V.K. and Brill, W. (1977): Molybdenum cofactors from molybdoenzymes and *in vitro* reconstitution of nitrogenase and nitrate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5468-5471.

**Pitterle, D.M. & Rajagopalan, K.V.** (1993): Biosynthesis of molybpterin in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the converting factor. *J. Biol. Chem.* **268**, 13499-13505.

**Rajagopalan, K.V. & Johnson, J.L.** (1992): The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.* **267**, 10199-10202.

**Reiss, J.** (2000): Genetics of molybdenum cofactor deficiency. *Human Genetics* **106** (2): 157-163.

**Reiter, S.**, Simmonds, H.A., Zollner, N., Braun, S.L. and Knedel, M. (1990): Demonstration of a combined deficiency of xanthine oxidase and aldehyde oxidase in xanthinuric patients not forming oxypurinol. *Clin. Chim. Acta.* **187**, 221-234.

**Rivers, S.L.**, McNaira, E., Blasco, F., Giordano, G., & Boxer, D.H., (1993): Molecular genetic analysis of the moa operon of *Escherichia coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis. *Mol Microbiol* **8** (6): 1071-1081.

**Romão, M.J.**, Archer, M., Moura, J.J.G., LeGall, J., Engh, R., Schneider, M., Hof, P., Huber, R. (1995): Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxidoreductase from *D. gigans*. *Science* **270**, 1170-1176.

**Sagi, M.**, Fluhr, R., Lips, H. (1999): Aldehyde Oxidase and Xanthine Dehydrogenase in a *flacca* Tomato Mutant with Deficient Absciscic Acid and Wilty Phenotype. *Plant Physiol.* **120**, 571-577.

**Sagi, M.**, Scazzocchio, C., Fluhr, R., (2002): The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the *flacca* phenotype in tomato plants. *The Plant Journal* **31**: 305-317

**Sambrook, J.**, Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

**Santamaria-Araujo J. A.**, Fischer B., Otte T., Nimtz M., Mendel R.R., *et al.* (2004): The tetrahydropyranopterin structure of the sulphur-free and metal-free molybdenum cofactor precursor. *J. Biol. Chem.* **279**: 15994-99.

**Scazzocchio, C.**, Holl, F.B. and Fogelman, A.I. (1973): The genetic control of molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. Allopurinol resistant mutants constitutive for xanthine dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **36**, 428-445.



**Schindelin, H.**, Kisker, C., Hilton, J., Rajagopalan, K.V. and Rees, D.C. (1996): The overall fold of *Rhodobacter sphaeroides* DMSO reductase is similar to that of FDH. *Science* **272**, 1615-1619.

**Schwartz, S.H.**, Léon-Kloosterziel, K.M., Koorneef, M. and Zeevaart, J.A.D. (1997): Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**, 161-166.

**Schwarz, G.**, Schulze, J., Bittner, F., Eilers, T., Kuper, J., Bollmann, G., Nerlich, A., Brinkmann, H., & Mendel, R.R. (2000): The Molybdenum Cofactor Biosynthetic Protein Cnx1 Complements Molybdate Repairable Mutants, Transfers Molybdenum to the Metal Binding Pterin, and Is Associated with the Cytoskeleton. *Plant Cell* **12**, 2455-2471.

**Schwarz, G.** (2005): Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. *Cell Mol. Life Sci.* **62 (23)**, 2792-2810.

**Schwarz G. & Mendel R.R.** (2006): Molybdenum Cofactor Biosynthesis and Molybdenum Enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 623-47.

**Seo, M.**, Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J.A.D., Koorneef, M., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (2000): The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:12908-12913.

**Shah, V.K. & Brill, W.J.** (1977): Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3249-3253.

**Solomon, PS.**, Lane, I., Hanson, GR., McEwan AG., (1997): Characterisation of the pterin molybdenum cofactor in dimethylsulfoxide reductase of *Rhodobacter capsulatus*. *EurJBiochem.* **246**(1):200-3.

**Sorger, G.J. & Giles, N.H.** (1965): Genetic control of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Genetics*. **52** (4): 777-88.

**Stallmeyer, B.**, Nerlich, A., Schiemann, J., Brinkmann, H. and Mendel, R.R. (1995): Molybdenum co-factor biosynthesis: the *Arabidopsis thaliana* cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three *Escherichia coli* proteins. *The Plant Journal* **8** (5), 751-762.

**Stallmeyer, B.**, Schwarz, G., Schulze, J., Nerlich, A., Reiss, J., Kirsch, J., & Mendel, R.R. (1999): The neurotransmitter receptor-anchoring protein gephyrin reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in bacteria, plants, and mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **96**: 1333-1338.

**Taylor, I.B.** (1991): Genetics of ABA synthesis. In Davies, W.J. and Jones, H.G. (eds). *Abscisic acid, physiology and biochemistry*. Bios Publishers. Oxford: 23-37

**Tomita, S.**, Ichikawa, T. and Ichikawa, Y. (1993): Retinal oxidase is identical to aldehyde oxidase. *FEBS Lett.* **336**, 272-274.

**Vartanian, N.**, Marcotte, L. and Giraudat, J. (1994): Drought rhizogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **104**, 761-767.

**Vergnes A.**, Pommier J., Toci R., Blasco F., Giordano G., Magalon A. (2006): NarJ chaperone binds on two distinct sites of the aponitrate reductase of *Escherichia coli* to coordinate molybdenum cofactor insertion and assembly. *J Biol Chem.* **281** (4):2170-6

**Viscontini, M.** (1971): Pterins and folate analogs. *Meth. Enzym.* XVIII 253-285

**Wahl, R.C.**, Warner, C.K., Finnerty, V. and Rajagopalan, K.V. (1982): *Drosophila melanogaster* *ma-I* mutants are defective in the sulfuration of desulfo Mo hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **257** (7), 3958-3962.

**Wahl, R.C. & Rajagopalan, K.V.** (1982): Evidence for the inorganic nature of the cyanolyzable sulfur of molybdenum hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **257** (3), 1354-1359.

**Walker-Simmons, M.**, Kudrna, D.A. and Warner, R.L. (1989): Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley. *Plant Physiol.* **90**, 728-733.

**Warner, C.K.** & Finnerty, V. (1981): Molybdenum hydroxylases in *Drosophila*. II. Molybdenum cofactor in xanthine dehydrogenase, aldehyde oxidase and pyridoxal oxidase. *Mol. Gen. Genet.* **184**, 92-96.

**Watanabe, T.**, Ihara, N., Itoh, T., Fujita, T. and Sugimoto, Y. (2000): Deletion

mutation in *Drosophila ma-I* homologous, putative molybdopterin cofactor sulfurase gene is associated with bovine xanthinuria type II. *J. Biol. Chem.* **275** (29), 21789-21792.

**Xiong L.**, Ishitani M., Lee H., Zhu JK. (2001): The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell.* **13**(9):2063-83.

**Yamamoto, T.**, Moriwaki, Y., Takahashi, S., Tsutsumi, Z., Tuneyoshi, K., Matsui, K., Cheng, J., Hada, T. (2003): Identification of a New Point Mutation in the Human Molybdenum Cofactor Sulfurase Gene That Is Responsible for Xanthinuria Type II. *Metabolism* **52** (11): 1501-1504.

## Anhang

### I Nukleotidsequenzen

#### I.1 *A. thaliana aba3-CT-cDNA*

Basierend auf der *A. thaliana aba3*-cDNA; GenBank Accession: AF325457

Länge der *A. thaliana aba3-CT-cDNA*.cds: 936 bp; aufgelistet von: 1 bis: 936;

Translatiert von: 7 bis: 927

```

Frame 1
      M   Q   L   P   S   E   D   L   E   S   K   E   S   F   P   S
      GGA TCC ATG CAA CTT CCT AGT GAA GAC CTT GAA AGT AAA GAA TCT TTT CCA AGC
              9              18              27              36              45              54

H   Y   L   K   S   I   T   V   Y   P   I   K   S   C   A   G   F   S   V   I
CAC TAC CTT AAG TCA ATT ACT GTA TAC CCG ATC AAG TCA TGT GCT GGA TTT TCT VTG ATA
      63              72              81              90              99              108

R   W   P   L   C   R   T   G   L   L   H   D   R   E   W   M   V   Q   G   L
CGT TGG CCA CTT TGC AGA ACA GGC CTG CTG CAT GAT CGA GAA TGG ATG GTT CAG GGT CTG
      123              132              141              150              159              168

T   G   E   I   L   T   Q   K   K   V   P   E   M   S   L   I   K   T   F   I
ACC GGT GAA ATT CTT ACC CAA AAG AAG GTG CCT GAG ATG TCT CTT ATA AAA ACC TTT ATC
      183              192              201              210              219              228

D   L   E   E   G   L   L   S   V   E   S   S   R   C   E   D   K   L   H   I
GAC CTT GAG GAA GGA CTA CTG TCT GTA GAA TCT TCT CGC TGC GAA GAC AAG TTG CAC ATC
      243              252              261              270              279              288

R   I   K   S   D   S   Y   N   P   R   N   D   E   F   D   S   H   A   N   I
AGA ATC AAG TCT GAT TCA TAT AAC CCG AGG AAC GAT GAG FTT GAT TCA CAT GCC AAC ATA
      303              312              321              330              339              348

L   E   N   R   N   E   E   T   R   I   N   R   W   F   T   N   A   I   G   R
CTT GAA AAC CGT AAT GAG GAA ACT AGA ATC AAT CGT TGG TTC ACC AAT GCC ATT GGT CGA
      363              372              381              390              399              408

Q   C   K   L   L   R   Y   S   S   S   T   S   K   D   C   L   N   R   N   K
CAA TGC AAG TTG CTA CGG TAT TCT AGC TCT ACT TCC AAA GAC TGC TTG AAC AGA AAC AAG
      423              432              441              450              459              468

S   P   G   L   C   R   D   L   E   S   N   I   N   F   A   N   E   A   Q   F
AGT CCT GGT TTG TGC AGA GAT TTG GAA AGC AAT ATC AAC FTT GCT AAT GAA GCT CAG TTC
      483              492              501              510              519              528

L   L   I   S   E   E   S   V   A   D   L   N   R   R   L   E   A   K   D   E
TTG TTA ATC TCC GAG GAG AGT GTT GCT GAC CTA AAC AGA AGA TTA GAA GCA AAA GAC GAG
      543              552              561              570              579              588

D   Y   K   R   A   H   E   K   L   N   P   H   R   F   R   P   N   L   V   I
GAT TAC AAA CGG GCT CAT GAA AAA CTC AAT CCA CAT AGG TTC AGA CCA AAT CTG GTT ATA
      603              612              621              630              639              648

S   G   G   E   P   Y   G   E   D   K   W   K   T   V   K   I   G   D   N   H
TCT GGA GGT GAA CCA TAC GGG GAA GAT AAA TGG AAA ACT GTC AAG ATA GGA GAC AAT CAT
      663              672              681              690              699              708

F   T   S   L   G   G   C   N   R   C   Q   M   I   N   I   S   N   E   A   G
TTC ACA TCA TTG GGC GGT TGT AAC CGG TGC CAG ATG ATA AAC ATA AGT AAT GAA GCT GGA
      723              732              741              750              759              768

L   V   K   K   S   N   E   P   L   T   T   L   A   S   Y   R   R   V   K   G
CTA GTG AAG AAA TCC AAT GAG CCC TTA ACA ACT TTA GCT TCA TAT AGG AGA GTA AAG GGA
      783              792              801              810              819              828

K   I   L   F   G   T   L   L   R   Y   E   I   D   E   K   R   Q   C   W   I
AAG ATC TTG TTT GGA ACG CTT TTG AGA TAC GAG ATT GAT GAG AAA AGA CAA TGT TGG ATT
      843              852              861              870              879              888

G   V   G   E   E   V   N   P   D   I   E
GGA GTT GGG GAA GAA GTT AAT CCA GAT ATT GAA TAA GGA TCC
      903              912              921              930

```

**I.2      *H. sapiens hmcs-CT-cDNA***

Basierend auf der *H. sapiens hmcs-cDNA*; GenBank Accession: NM\_017947

Länge der *H. sapiens hmcs-CT-cDNA*: 981 bp; aufgelistet von: 1 bis: 981;

Translatiert von: 7 bis: 972

```

Frame 1      M   S   E   K   A   A   G   V   L   E   G   A   L   G   P   H
              GGA TCC ATG TCA GAG AAA GCT GCA GGA GTC CTG GAG GGG GCC CTT GGG CCA CAT
              9      18      27      36      45      54

V   V   T   N   L   Y   L   Y   P   I   K   S   C   A   A   F   E   V   T   R
GTT GTC ACT AAC CTT TAT CTC TAT CCA ATC AAA TCC TGT GCT GCA TTT GAG GTG ACC AGG
63      72      81      90      99      108

W   P   V   G   N   Q   G   L   L   Y   D   R   S   W   M   V   V   N   H   N
TGG CCT GTA GGA AAC CAA GGG CTG CTA TAT GAC CGG AGC TGG ATG GTT GTG AAT CAC AAT
123      132      141      150      159      168

G   V   C   L   S   Q   K   Q   E   P   R   L   C   L   I   Q   P   F   I   D
GGT GTT TGC CTG AGT CAG AAG CAG GAA CCC CGG CTC TGC CTG ATC CAG CCC TTC ATC GAC
183      192      201      210      219      228

L   R   Q   R   I   M   V   I   K   A   K   G   M   E   P   I   E   V   P   L
TTG CGG CAA AGG ATC ATG GTC ATC AAA GCC AAA GGG ATG GAG CCT ATA GAG GTG CCT CTT
243      252      261      270      279      288

E   E   N   S   E   R   T   Q   I   R   Q   S   R   V   C   A   D   R   V   S
GAG GAA AAT AGT GAA CGG ACT CAG ATT CGC CAA AGC AGG GTC TGT GCT GAC AGA GTA AGT
303      312      321      330      339      348

T   Y   D   C   G   E   K   I   S   S   W   L   S   T   F   F   G   R   P   C
ACT TAT GAT TGT GGA GAA AAA ATT TCA AGC TGG TTG TCA ACA TTT TTT GGC CGT CCT TGT
363      372      381      390      399      408

N   L   I   K   Q   S   S   N   S   Q   R   N   A   K   K   K   H   G   K   D
AAT TTG ATC AAA CAA AGT TCA AAC TCT CAA AGG AAT GCA AAG AAG AAA CAT GGA AAA GAT
423      432      441      450      459      468

Q   L   P   G   T   M   A   T   L   S   L   V   N   E   A   Q   Y   L   L   I
CAA CTT CCT GGT ACA ATG GCC ACC CTT TCT CTG GTG AAT GAG GCA CAG TAT CTG CTG ATC
483      492      501      510      519      528

N   T   S   S   I   L   E   L   H   R   Q   L   N   T   S   D   E   N   G   K
AAC ACA TCC AGT ATT TTG GAA CTT CAC CGG CAA CTA AAC ACC AGT GAT GAG AAT GGA AAG
543      552      561      570      579      588

E   E   L   F   S   L   K   D   L   S   L   R   F   R   A   N   I   I   I   N
GAG GAA TTA TTC TCA CTG AAG GAT CTC AGC TTG CGT TTT CGT GCC AAT ATT ATT ATC AAT
603      612      621      630      639      648

G   K   R   A   F   E   E   E   K   W   D   E   I   S   I   G   S   L   R   F
GGA AAA AGG GCT TTT GAA GAA GAG AAA TGG GAT GAG ATT TCA ATT GGC TCT TTG CGT TTC
663      672      681      690      699      708

Q   V   L   G   P   C   H   R   C   Q   M   I   C   I   D   Q   Q   T   G   Q
CAG GTT TTG GGG CCT TGT CAC AGA TGC CAG ATG ATT TGC ATC GAC CAG CAA ACT GGG CAA
723      732      741      750      759      768

R   N   Q   H   V   F   Q   K   L   S   E   S   R   E   T   K   V   N   F   G
CGA AAC CAG CAT GTT TTC CAA AAA CTT TCT GAG AGT CGT GAA ACA AAG GTG AAC TTT GGC
783      792      801      810      819      828

M   Y   L   M   H   A   S   L   D   L   S   S   P   C   F   L   S   V   G   S
ATG TAC CTG ATG CAT GCA TCA TTG GAT TTA TCC TCC CCA TGT TTC CTG TCT GTA GGA TCT
843      852      861      870      879      888

Q   V   L   P   V   L   K   E   N   V   E   G   H   D   L   P   A   S   E   K
CAG GTG CTC CCT GTG TTG AAA GAG AAT GTG GAA GGT CAT GAT TTA CCT GCA TCT GAG AAA
903      912      921      930      939      948

H   Q   D   V   T   S
CAC CAG GAT GTT ACC TCC TAA GGA TCC
963      972      981

```

**I.3      *H. sapiens* mARC2-cDNA**

Nucleotide Accession: NM\_017898

Länge der *H. sapiens* mARC2-cDNA.: 1020 bp; aufgelistet von: 1 bis: 1020;

Translatiert von: 7 bis: 1011

```

Frame 1      M   G   A   S   S   S   S   A   L   A   R   L   G   L   P   A
             GGA TCC ATG GGC GCT TCC AGC TCC TCC GCG CTG GCC CGC CTC GGC CTC CCA GCC
              9      18      27      36      45      54

R   P   W   P   R   W   L   G   V   A   A   L   G   L   A   A   V   A   L   G
CGG CCC TGG CCC AGG TGG CTC GGG GTC GCC GCG CTA GGA CTG GCC GCC GTG GCC CTG GGG
 63      72      81      90      99      108

T   V   A   W   R   R   A   W   P   R   R   R   R   R   L   Q   Q   V   G   T
ACT GTC GCC TGG CGC CGC GCA TGG CCC AGG CGG CGC CGG CTG CAG CAG GTG GGC ACC
 123      132      141      150      159      168

V   A   K   L   W   I   Y   P   V   K   S   C   K   G   V   P   V   S   E   A
GTG GCG AAG CTC TGG ATC TAC CCG GTG AAA TCC TGC AAA GGG GTG CCG GTG AGC GAG GCT
 183      192      201      210      219      228

E   C   T   A   M   G   L   R   S   G   N   L   R   D   R   F   W   L   V   I
GAG TGC ACG GCC ATG GGG CTG CGC AGC GGC AAC CTG CGG GAC AGG TTT TGG CTG GTG ATT
 243      252      261      270      279      288

K   E   D   G   H   M   V   T   A   R   Q   E   P   R   L   V   L   I   S   I
AAG GAA GAT GGA CAC ATG GTC ACT GCC CGA CAG GAG CCT CGC CTC GTG CTC ATC TCC ATC
 303      312      321      330      339      348

I   Y   E   N   N   C   L   I   F   R   A   P   D   M   D   Q   L   V   L   P
ATT TAT GAG AAT AAC TGC CTG ATC TTC AGG GCT CCA GAC ATG GAC CAG CTG GTT TTG CCT
 363      372      381      390      399      408

S   K   Q   P   S   S   N   K   L   H   N   C   R   I   F   G   L   D   I   K
AGC AAG CAG CCT TCC TCA AAC AAA CTC CAC AAC TGC AGG ATA TTT GGC CTT GAC ATT AAA
 423      432      441      450      459      468

G   R   D   C   G   N   E   A   A   K   W   F   T   N   F   L   K   T   E   A
GGC AGA GAC TGT GGC AAT GAG GCA GCT AAG TGG TTC ACC AAC TTC TTG AAA ACT GAA GCG
 483      492      501      510      519      528

Y   R   L   V   Q   F   E   T   N   M   K   G   R   T   S   R   K   L   L   P
TAT AGA TTG GTT CAA TTT GAG ACA AAC ATG AAG GGA AGA ACA TCA AGA AAA CTT CTC CCC
 543      552      561      570      579      588

T   L   D   Q   N   F   Q   V   A   Y   P   D   Y   C   P   L   L   I   M   T
ACT CTT GAT CAG AAT TTC CAG GTG GCC TAC CCA GAC TAC TGC CCG CTC CTG ATC ATG ACA
 603      612      621      630      639      648

D   A   S   L   V   D   L   N   T   R   M   E   K   K   M   K   M   E   N   F
GAT GCC TCC CTG GTA GAT TTG AAT ACC AGG ATG GAG AAG AAA ATG AAA ATG GAG AAT TTC
 663      672      681      690      699      708

R   P   N   I   V   V   T   G   C   D   A   F   E   E   D   T   W   D   E   L
AGG CCA AAT ATT GTG GTG ACC GGC TGT GAT GCT TTT GAG GAG GAT ACC TGG GAT GAA CTC
 723      732      741      750      759      768

L   I   G   S   V   E   V   K   K   V   M   A   C   P   R   C   I   L   T   T
CTA ATT GGT AGT GTA GAA GTG AAA AAG GTA ATG GCA TGC CCC AGG TGT ATT TTG ACA ACG
 783      792      801      810      819      828

V   D   P   D   T   G   V   I   D   R   K   Q   P   L   D   T   L   K   S   Y
GTG GAC CCA GAC ACT GGA GTC ATA GAC AGG AAA CAG CCA CTG GAC ACC CTG AAG AGC TAC
 843      852      861      870      879      888

R   L   C   D   P   S   E   R   E   L   Y   K   L   S   P   L   F   G   I   Y
CGC CTG TGT GAT CCT TCT GAG AGG GAA TTG TAC AAG TTG TCT CCA CTT TTT GGG ATC TAT
 903      912      921      930      939      948

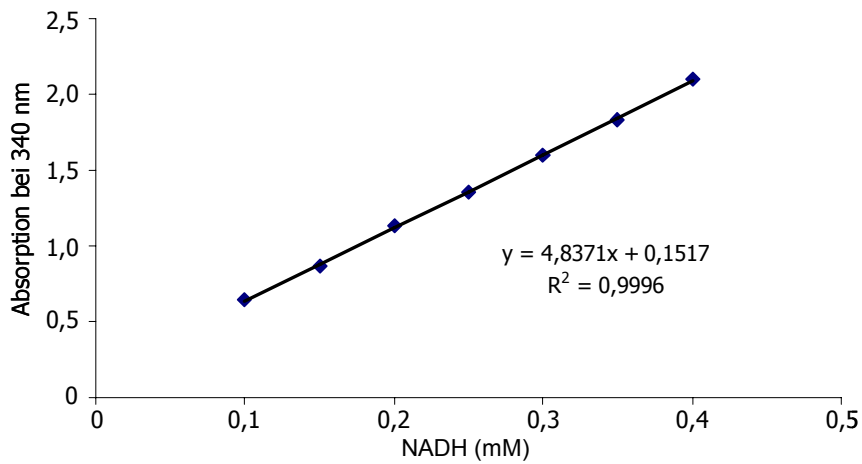
Y   S   V   E   K   I   G   S   L   R   V   G   D   P   V   Y   R   M   V
TAT TCA GTG GAA AAA ATT GGA AGC CTG AGA GTT GGT GAC CCT GTG TAT CGG ATG GTG TAG
 963      972      981      990      999      1008

AAG CTT

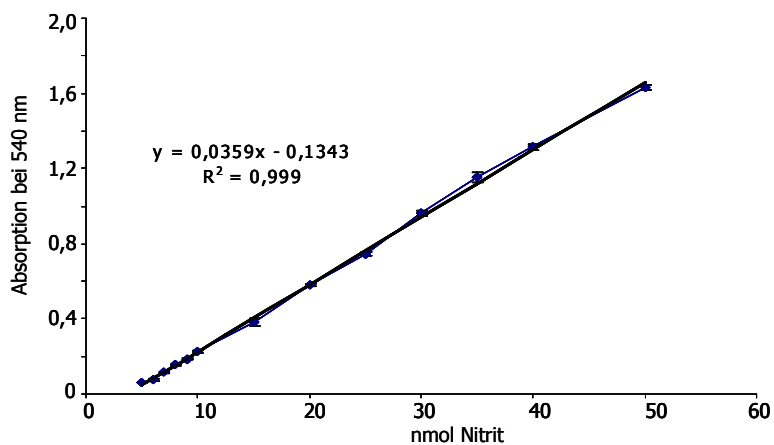
```

## II Kalibriergeraden

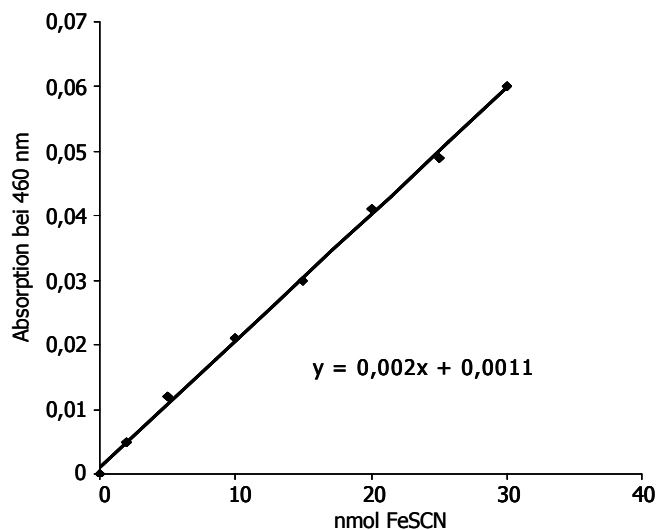
### II.1 NADH-Kalibriergerade



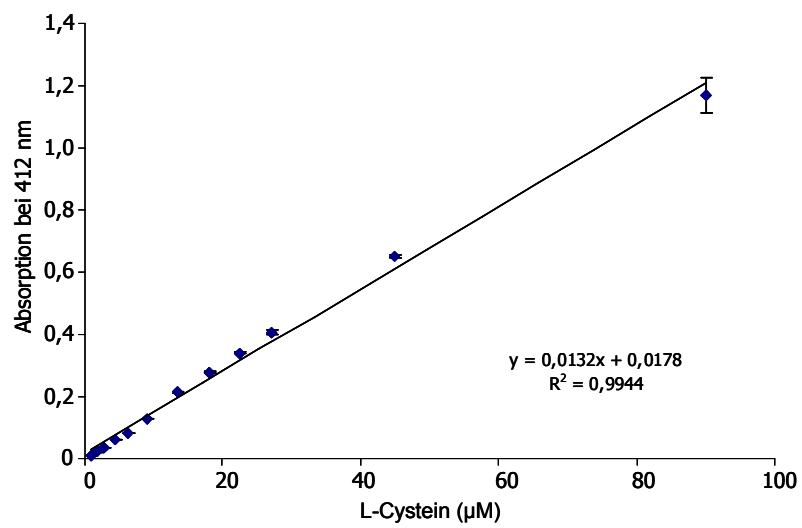
### II.2 *nit-1*-Nitrit-Kalibriergerade.



### II.3 Thiocyanat-Kalibriergerade



## II.4 L-Cystein-Kalibriergerade



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf-R. Mendel für die Unterstützung, die ich durch ihn seit meinem Studium erfahren habe. Insbesondere danke ich ihm für die Möglichkeit, meine Forschungsergebnisse auf internationalen Kongressen zu präsentieren und die Gelegenheit in ausländischen Laboratorien Erfahrungen zu sammeln. Nicht zuletzt danke ich ihm dafür, dass er es mir ermöglichte, dieses spannende und vielseitige Thema zu bearbeiten.

Dr. Florian Bittner danke ich ganz besonders für die engagierte und geduldige Betreuung. Sein nicht nachlassendes Interesse und sein Vertrauen in meine Arbeit, verbunden mit der Fähigkeit stets zu motivieren, hat ganz wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Besonders danke ich ihm für seine stete Hilfsbereitschaft, aber auch für die Diskussionsbereitschaft und die immer ausgesprochen freundliche, faire und humorvolle Atmosphäre. Er hat maßgeblich dazu beigetragen, meine Begeisterung für die Forschung aufrecht zu erhalten.

Torsten Heidenreich und Julia Teschner danke ich für die tolle Zusammenarbeit und den steten wissenschaftlichen Austausch sowie ihre Hilfsbereitschaft auf die ich mich immer verlassen konnte. Bei Madeleine Peschke möchte ich mich für die unermüdliche Hilfe im Laboralltag bedanken, durch die mir die Arbeit im Labor erheblich erleichtert wurde.

Bei meiner Diplomandin Bettina Wahl möchte ich mich für eine erfolgreiche und sehr schöne Zusammenarbeit bedanken. Bei allen anderen aktuellen und ehemaligen Kollegen im Biozentrum bedanke ich mich für das immer sehr freundliche und kollegiale Arbeitsklima. So verbinde ich viele schöne Erinnerungen über die Arbeit hinaus mit der Promotions-Zeit in Braunschweig.

Bei Manuela Trani von der Emory University in Atlanta bedanke ich mich für die Durchführung der aufwändigen XDH-Expressionen und –Aktivitätsmessungen im Zusammenhang mit ABA3-CT.

Prof. Dr. D. Zachmann und Claudia Kraft danke ich für die freundliche Durchführung der ICP-MS-Messungen.



Antje Havemeyer von der Universität Kiel danke ich herzlich für die Durchführung der Benzamidoxim-Oxidase-Aktivitäts-Messungen an den HMCS-CT-Varianten und die tolle Kooperation bei den mARC-Proteinen.

Des weiteren danke ich Prof. Dr. Russ Hille, dessen Hilfe mir einen dreimonatigen Aufenthalt in seinem Labor ermöglicht hat. Ihm und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe danke ich für eine interessante und schöne Zeit in Columbus.

Selbstverständlich danke ich ganz besonders meiner Familie, die mich immer in allen Belangen unterstützt und motiviert hat. Ich danke ihnen für die andauernde, liebevolle und grenzenlose Unterstützung, der ich mir immer gewiss sein konnte und kann, und die mir vieles erst ermöglicht hat.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Jens Sinagowitz danken, der immer für mich da ist und ohne dessen liebevolle Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich danke ihm für den Rückhalt, den er mir zu jeder Zeit bietet und seine großartige Unterstützung auf die ich mich immer verlassen kann.